Darstellung und cytostatische Eigenschaften von veresterten N-Hydroxymethylverbindungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

UWE KEUP

aus Berlin

1968

9704

Darstellung und cytostatische Eigenschaften von veresterten N-Hydroxymethylverbindungen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

U w e K e u p

aus Berlin

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 1968

Dekan : Professor Dr. H. Blume

I. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G.Weitzel

II. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn

Professor Dr. Dr. G ü n t h e r W e i t z e l

am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Lehrer danke ich für die Zuweisung des Themas und für die mir während dessen Bearbeitung jederzeit erwiesene großzügige Förderung.

Gleichzeitig danke ich Herrn Professor Dr. Friedhelm Schneider für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen. Der mikroanalytischen Abteilung des Institutes unter Leitung von Frau Akad. Oberrätin Dr. Anna-Maria Fretzdorff danke ich für die analytischen Arbeiten.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547605_0045

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung 7

2. Literaturübersicht

a.) N-Hydroxymethylverbindungen 9

b.) Veresterte N-Hydroxymethylverbindungen 13

3. Eigene Untersuchungen

a.) Synthesen und Eigenschaften der Ausgangsprodukte 15

b.) Darstellung der veresterten N-Hydroxymethylverbindungen 23

c.) Stabilität der Ester in wäßriger Lösung 29

d.) Stabilität der Ester gegenüber Rattenleber- und Mäuseasciteshomogenaten 33

e.) Einwirkung der Ester auf das Mäuseascites-carcinom in vitro 42

f.) Einwirkung auf das Mäuseascitescarcinom in vivo 49

4. Beschreibung der Versuche 52

a.) Präparativer Teil 54

b.) Biochemischer Teil 78

5. Zusammenfassung 83

6. Literaturverzeichnis 85

1. Einleitung und Problemstellung

Vor einigen Jahren fanden W e i t z e l und Mitarb.[1] in N-Hydroxymethylverbindungen eine weitere Klasse cytostatisch hochwirksamer Substanzen, die das Wachstum des Mäuseascitescarcinoms (Ehrlich) in vivo zum Stillstand, bzw. ein vorhandenes Ascitescarcinom zur Rückbildung bringen konnten. Auf Grund ihrer Fähigkeit zur Aminoalkylierung H-acider Verbindungen ist als Angriffspunkt dieser Substanzen eine Aminomethylierung heterocyclischer Basen der makromolekularen Nucleinsäuren anzunehmen. Unter dem Einfluß von N-Hydroxymethylverbindungen kam es ferner zu ausgeprägten Änderungen der Metabolit-Konzentrationen, und zwar zu einer Senkung der Konzentrationen von ATP und NAD^+ sowie zum Anstieg von Nicotinsäureamid, Fructosediphosphat und Triosephosphat.

Die meisten N-Hydroxymethylverbindungen sind in wäßriger Lösung jedoch nicht stabil und dissoziieren verschieden stark in Formaldehyd und organischen Rest. Die Autoren konnten allerdings nachweisen, daß der cytostatische Effekt der intakten N-Hydroxymethylverbindung zuzuschreiben ist, zumal Formaldehyd die Metabolitkonzentrationen nur geringfügig ändert.

Es war daher im Hinblick auf eine Stabilisierung der N-Hydroxymethylgruppe von Interesse, durch geeignete Veresterung Substanzen herzustellen, die im Organismus

hydrolysieren und dann zur Freisetzung der wirksamen N-Methylolverbindung führen, ohne daß es sogleich zur Formaldehydabspaltung kommt. Derartige Ester sollten einerseits labil genug sein, um unter physiologischen Bedingungen zu zerfallen, andererseits aber nicht durch zu große Stabilität die Freisetzung der N-Hydroxymethylverbindung verhindern.

Zur Darstellung der N-Hydroxymethylverbindungen wurden folgende Ausgangssubstanzen verwendet:
Piperidin, Morpholin, verschieden substituierte Imidazolthione-(2) und Oxdialzolthione-(2), Succinimid, Phthalimid, Nicotinsäureamid sowie Diphenylhydantoin und Theophyllin. Als Säuren wurden Essigsäure, Benzoesäure und Zimtsäure gewählt.

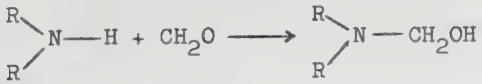
Neben der Stabilitätsmessung in wäßriger Lösung nach der pH-Stat-Methode wurde die Stabilität der Ester gegenüber Homogenaten von Rattenleber- und Mäuseasciteszellen untersucht. Einblick in die intrazellulären Angriffspunkte gaben die Bestimmung der Einbauraten von C-14 markiertem Thymidin, Uridin und Leucin.

Außerdem wurden die Ester am Ehrlich-Ascites-Carcinom der Maus in vivo getestet.

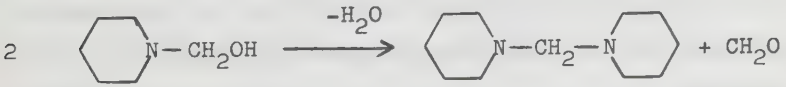
2. Literaturübersicht

a.) N-Hydroxymethylverbindungen

N-Hydroxymethylverbindungen von Basen wie Piperidin, Morpholin, Dimethylamin u.ä. lassen sich aus wäßrigem Formaldehyd und dem Amin unter Kühlung darstellen und durch Kaliumcarbonat abscheiden:



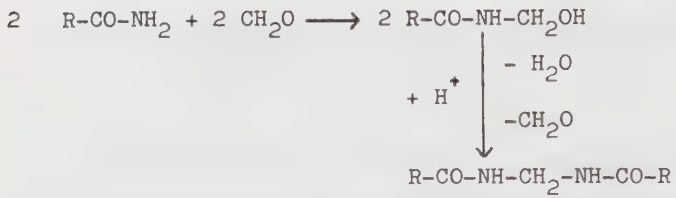
Schon 1895 wird von H e n r y[2] die Umsetzung von Piperidin bzw. Dimethylamin mit Formaldehyd beschrieben. Die öligen, nicht destillierbaren N-Halbacetale des Formaldehyds sind nur schwer rein zu erhalten und nur in der Kälte beständig. Beim Erwärmen zerfallen sie in Amin und Formaldehyd, wobei sich teilweise auch N,N'-Vollacetale bilden können[3].



Derartige Methylenbisamine als Hauptprodukt erhält man auch, wenn man Formaldehyd mit sekundären Aminen ohne Kühlung mischt.

Ausgehend von Phthalimid stellte S a c h s[4] 1898 durch Umsetzung mit Formaldehyd im Bombenrohr N-Hydroxymethylphthalimid dar.

Später gelang es E i n h o r n[5,6], entsprechende Hydroxymethylverbindungen von primären Carbonamiden darzustellen, und zwar durch Addition von Formaldehyd an die Amide unter der Wirkung basischer Kondensationsmittel wie Kaliumcarbonat oder Natriumhydroxyd; in Gegenwart von Säure gehen die N-Hydroxymethylcarbonamide leicht in Methylen-bis-amide über:



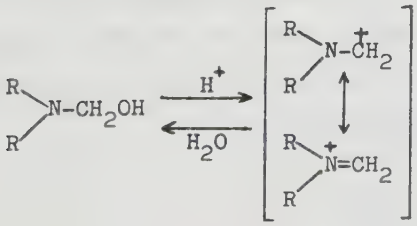
Auch Diamide, wie Harnstoff, Bernsteinsäurediamid und Oxamid konnten durch Reaktion mit Formaldehyd in die entsprechenden symmetrischen Dihydroxymethylverbindungen überführt werden[7,8].

Zahlreiche Stoffe folgten, ohne daß sich bei der Bereitung wesentliche Änderungen ergaben. So stellten beispielsweise C h e r b u l i e z u. S u l z e r das N-Hydroxymethylsuccinimid[9] und das N,N'-Dihydroxymethyldioxopiperazin[10] her und P a w n e y u. Mitarb. das entsprechende Derivat des Maleinimids[11].

Ebenfalls von cyclischen Säureimiden gingen kürzlich Z i n n e r u. B ö h l k e[12] aus, indem sie ver-

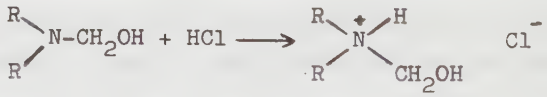
schieden substituierte Urazole in 4-Stellung zunächst mit Formaldehyd umsetzten und anschließend aus den 4-Hydroxymethylurazolen mit Acetanhydrid, Benzoylchlorid und Phenylisocyanat die jeweiligen Ester bereiteten.
Schließlich haben W e i t z e l u. Mitarb.[1] im Rahmen ihrer Untersuchungen über cytostatische Substanzen eine größere Klasse von N-Hydroxymethylverbindungen hergestellt und dabei auch heterocyclische Basen wie Imidazolthion-(2), Benzimidazol, Pyrrolidin, Hydantoin u.a. mit einbezogen.

Eingehende Untersuchungen über N-Hydroxymethylamine stellten H e l l m a n n u. Mitarb.[13,14] an, nachdem sie erkannten, daß diese Verbindungen eine zentrale Stellung innerhalb der Mannich-Reaktion einnehmen. Bei dieser Kondensation von H-aciden Verbindungen mit Formaldehyd und Aminen entsteht aus dem Amin und dem Formaldehyd zunächst ein N-Oxmethylderivat, das unter dem Einfluß von Wasserstoff-Ionen ein Carbenium-Immonium-Ion liefert, welches als das "aminomethylierende Agens" in der Mannich-Reaktion anzusprechen ist,



und mit der H-aciden Komponente die Mannichbase liefert. Das Carbenium-Immonium-Ion ist nur in saurer Lösung existenzfähig; bei pH7 bildet es mit Wasser das N-Oxymethylamin zurück.

Die Bildung des Carbenium-Immonium-Ions in Gegenwart von wäßriger Säure erscheint zunächst ungewöhnlich, da man annehmen sollte, daß der Stickstoff als das am stärksten basische Zentrum der Molekel das Proton an sich zieht. Nach Befunden von B o d e n d o r f u. K o r a l e w s k i[15] sowie von B o e h m e u. K r e u t z k a m p[3] werden jedoch nur mit wasserfreien Säuren die sehr labilen, feuchtigkeitsempfindlichen Ammoniumsalze erhalten;



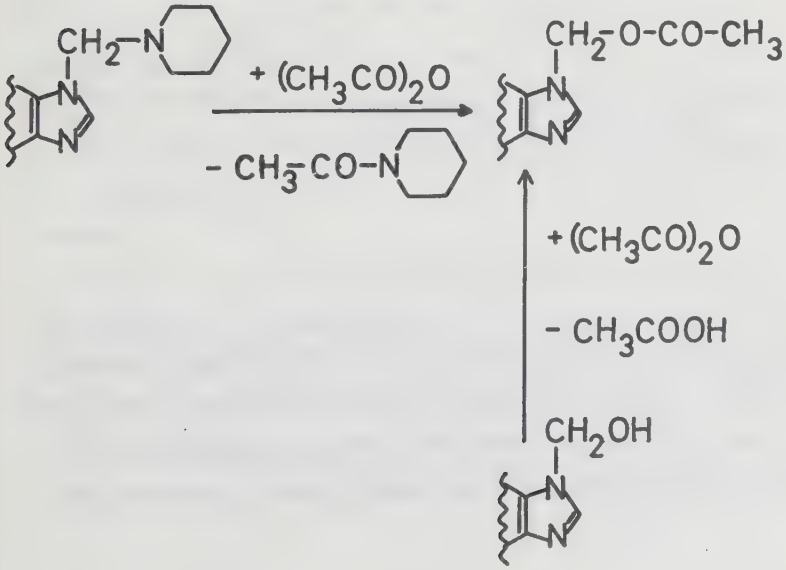
die in Gegenwart von Wasser sofort in der oben geschilderten Weise hydrolysieren.

In einer weiteren Arbeit beschreibt H e l l m a n n[16] das Verhalten von N-Hydroxymethylamiden, die, ebenso wie vorstehend beschrieben, unter Säureeinfluß in ein Carbenium-Immonium übergehen und zur Substitution eines H-Atoms geeigneter Substanzen befähigt sind.

b.) Versterte N-Hydroxymethylverbindungen

Eine zusammenfassende Untersuchung über versterte N-Hydroxymethylverbindungen liegt bislang nicht vor. In der Literatur finden sich jedoch vereinzelte Hinweise auf derartige Produkte: So beschreiben C h e r b u l i e z u. Mitarb.[9,10] den Acetylester vom N-Hydroxymethylsuccinimid sowie die Umsetzung von N,N'-Dihydroxymethyldioxopiperazin mit Benzoesäureanhydrid in Pyridin zum entsprechenden Benzoylderivat.

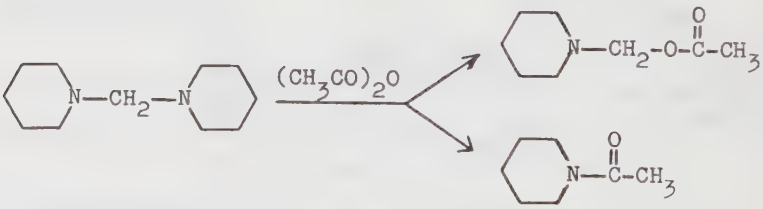
Im Zusammenhang mit Arbeiten über Mannichbasen stellten R o t h u. Mitarb.[17] Acetoxymethylverbindungen durch Acetolyse von N-Mannichbasen her. Wenn die Autoren z.B. 7-Piperidinomethyltheophyllin der Acetolyse (Acetanhydrid/Natriumacetat) unterwarfen, so entstand aus der



Mannichbase im Sinne einer Eliminierungs-Additions-Reaktion N-Acetoxymethyltheophyllin; das gleiche Acetoxymethylderivat entstand bei der Acetylierung von N-Methyloltheophyllin.

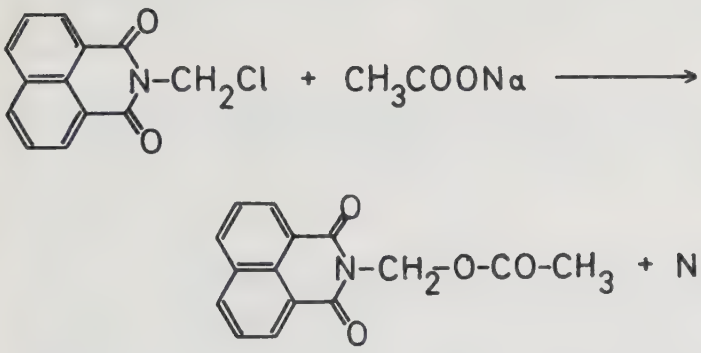
Dazu ist zu bemerken, daß lediglich die NH-acide Komponente der Mannichbase, nicht aber das Amin den Ester liefert.

B o e h m e u. H a r t k e [18] gelangen zu Acetoxymethylverbindungen durch Spaltung von Aminalen, z.B. Dipiperidinomethan mit Essigsäureanhydrid. Die Umsetzung wird unter Feuchtigkeitsausschluß bei Zimmertemperatur ausgeführt; als Nebenprodukt entsteht dabei die jeweilige N-Acetylverbindung der Basen:



Einen anderen Weg beschreibt derselbe Autor,[19] indem er die außerordentlich hohe Reaktionsfähigkeit des Chloratoms im N-Chlormethylnaphthalimid zur Umsetzung mit Natriumacetat ausnutzt und dadurch neben Natriumchlorid

den gewünschten Ester erhält.



3. Eigene Untersuchungen

a.) Synthesen und Eigenschaften der Ausgangsprodukte

Bei der Darstellung der N-Hydroxymethylverbindungen wurde nach verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Angaben verfahren, und dabei auch Amine, Amide und Imide der Hydroxymethylierung zugänglich gemacht, bei denen eine solche Reaktion bislang noch nicht durchgeführt wurde.

So wurden die N-Hydroxymethylverbindungen von Hydantoin, Benzimidazol, Nicotinsäureamid, Isonicotinsäureamid, verschieden substituierten Imidazolthionen-(2) sowie Benzimidazolthion-(2) nach den Angaben von W e i t z e l u. Mitarb.[1], N-Hydroxymethylpiperidin nach einer Vorschrift von H e l l m a n n und O p i t z[20] erhalten.

Versuche, das letztgenannte Produkt durch Vakuumdestillation zu reinigen, führten zum vollkommenen Zerfall in Piperidin und Formaldehyd.

Bei der Darstellung des N-Hydroxymethylsuccinimids wurde zunächst nach einer Vorschrift von C h e r b u l i e z und S u l z e r[9] verfahren. Das verlustreiche Umkristallisieren aus siedendem Benzol, wobei größtenteils Zersetzung in Succinimid und Formaldehyd eintrat, wurde dadurch umgangen, daß das nach dem Eindampfen anfallende Produkt durch Aufstreichen auf Tonplatten und Trocknen über Phosphorpentoxid i.V. gereinigt und analysenrein erhalten wurde. Die Substanz ist unter Feuchtigkeitsausschluß in der Kälte mehrere Monate lang haltbar, zersetzt sich aber unter Formaldehydabspaltung verhältnismäßig rasch bei Zimmertemperatur an der Luft.

N-Hydroxymethylphthalimid - von S a c h s durch Einwirkung von Formalinlösung auf Phthalimid im Bombenrohr dargestellt[4] - konnte einfacher durch Auflösen von Phthalimid in verdünnter siedender Formalinlösung unter Zusatz von Kaliumcarbonat gewonnen werden. Die beim Erkalten gut kristallisierende Verbindung hält den Formaldehyd relativ locker gebunden; bei längerem Stehen an der Luft tritt jedenfalls Formaldehydgeruch auf.

Auf die gleiche Weise wurde in nahezu quantitativer

Ausbeute die N-Methylolverbindung des Theophyllins gewonnen. Beim Umkristallisieren aus heißem Äthanol tritt allerdings totale Formaldehydabspaltung ein; acetyliert man nämlich das umkristallisierte Produkt, so läßt sich lediglich die N-Acetylverbindung und nicht das Acetoxymethylderivat isolieren.

Bereitet die Darstellung des N-Hydroxymethylhydantoins keine besonderen Schwierigkeiten, so läßt sich diese Verbindung infolge der leichten Formaldehydabspaltung nicht verestern. Der Grund liegt in der Reaktivität der Imidgruppe. Diese wird, wie in allen Säureimiden, durch die beiden Carbonylgruppen acidifiziert, ein Effekt, der hier aber nicht in gleicher Stärke zur Auswirkung kommt wie im Succin- oder Phthalimid, denn die Wirkung der Carbonylgruppen erstreckt sich beim Hydantoin auch auf das N^1-Atom und kann somit die Imidgruppe nur schwächer beeinflussen. Elektronenanziehende Substituenten wie Arylgruppen in der Molekel heben diese nachteilige Wirkung weitgehend auf; so läßt sich 5,5-Diphenylhydantoin[21] in 50%igem Äthanol mit Formaldehyd in nahezu quantitativer Ausbeute hydroxymethylieren und anschließend glatt verstern. Auch bei großem Formaldehydüberschuß tritt Hydroxymethylierung nur am Imidstickstoff ein.

Bei der Umsetzung äquimolarer Mengen Formaldehyd und

Imidazolthion-(2) entsteht das schon von W e i t z e l u. Mitarb. beschriebene 1-Hydroxymethylimidazolthion-(2)[1]. Erwärmt man nun in Wasser Imidazolthion-(2) mit der doppelten Menge Formaldehyd, so kristallisiert beim Erkalten ein Produkt aus, das, wie die Analyse ergab, zwei Hydroxymethylgruppen enthält. Beim Mono- wie beim Bishydroxymethylderivat war die Frage zu klären, ob die Hydroxymethylierung nur am Stickstoff, oder, wie früher angenommen, auch an der Thiolgruppe der tautomeren Mercaptostruktur erfolgt[42,43]. Darüber konnte die Kernresonanzspektroskopie Klarheit verschaffen[22].

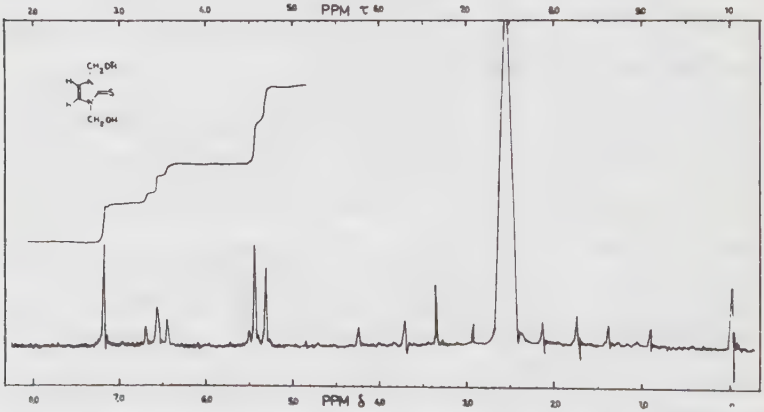
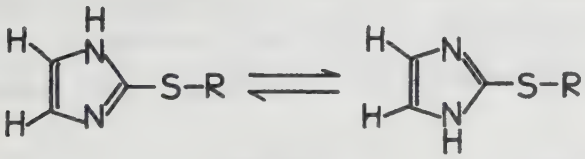


Abb. 1 NMR-Spektrum von N,N'-Bis(hydroxymethyl)-imidazolthion-(2)

In Abb. 1 ist das NMR-Spektrum der Bishydroxymethylverbindung, gemessen in Dimethylsulfoxid, dargestellt. Die Verbindung kann auf Grund des Spektrums als an beiden Stickstoffatomen, also symmetrisch, substituiert formuliert werden.

Die Signale wurden folgendermaßen zugeordnet:
das Singulett bei 2,8 τ den beiden olefinischen Protonen; es erfolgt keine Aufspaltung, da auf Grund der Symmetrie des Moleküls beide Protonen gleichwertig sind;
das Triplett den Hydroxylprotonen (Aufspaltung durch die benachbarten Methylenprotonen);
das Dublett den Methylenprotonen (Aufspaltung durch die Protonen der Hydroxylgruppe).
Die Integration ergab ein Flächenverhältnis von Singulett : Triplett : Dublett = 2 : 2 : 4. Die bei höheren τ -Werten auftretenden Signale entsprechen Banden und Seitenbanden des Lösungsmittels DMSO.

Nimmt man beim Monohydroxymethylderivat des Imidazolthions-(2) eine Substitution am Schwefel an,



so würde im NMR-Spektrum eine derartige Verbindung als symmetrisch interpretiert werden können, da die beiden tautomeren Strukturen infolge der sehr raschen Einstellung der Gleichgewichte von der Kernresonanz nicht gesondert erfaßt werden, und somit die beiden olefinischen

Protonen ein Signal ergeben müßten.

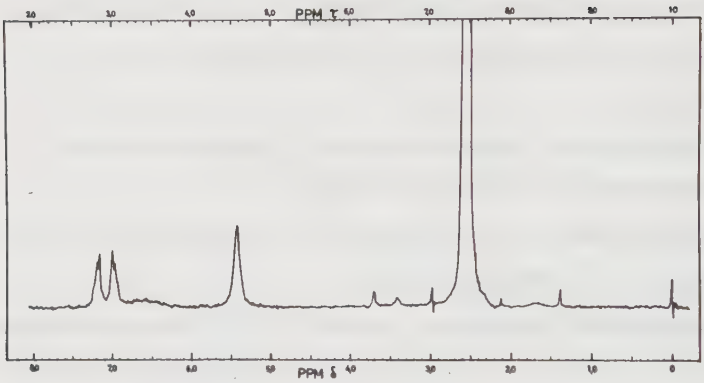
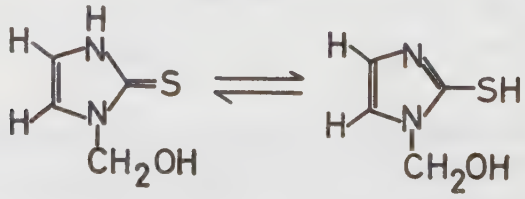


Abb. 2 NMR-Spektrum von N-Hydroxymethylimidazolthion-(2)

Das NMR-Spektrum (Abb. 2) weist aber bei τ = 2,9 ein Signal nach Art eines A-B Spektrums auf, d.h. die beiden Protonen an C_4 und C_5 verhalten sich in der Kernresonanz nicht gleichartig, was eine unsymmetrische Substitution voraussetzt, so daß diese Verbindung als N-Hydroxymethylimidazolthion-(2) formuliert werden kann:



Die Bande bei 4,55 τ ist der Hydroxymethylgruppe, das an-

gedeutete Signal bei 3,4 τ der NH- bzw. SH-Schwingung zuzuordnen.

Entsprechend ist zu erwarten, daß 2-Mercaptobenzimidazol in der -thion-(2) -Form reagiert, die Hydroxymethylierung also an den beiden Stickstoffatomen erfolgt; analoge Mannichbasen - Aminomethylierung an beiden N-Atomen - stellten Z i n n e r u. Mitarb.[23] her.

5-Phenyl- und 5-Pyrazyl-oxdiazolthion-(2) wurden aus Pyrazinsäureanhydrid bzw. Benzoesäureanhydrid und Thiophosgen gewonnen[24,36,37]. Beide Substanzen lassen sich glatt mit Formaldehyd umsetzen und liefern im Falle des Phenylderivates in 87%iger Ausbeute farblose Nadeln, während das Pyrazylderivat mit 76%iger Ausbeute in Form gelber Kristalle anfällt.

Für das 5-Phenyl-oxdiazolthion-(2) ergibt sich ein Konstitutionsbeweis aus dem Infrarotspektrum[25].

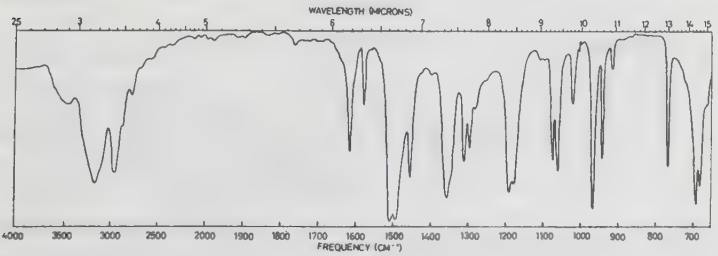


Abb. 3 IR-Spektrum von 5-Phenyl-oxdiazolthion-(2)

Im NH-Schwingungsgebiet findet sich bei 3150 cm^{-1} eine intensive Bande, während eine solche im Bereich der SH-Absorption fehlt. Damit kann die Mercaptostruktur ausgeschlossen werden.

Im IR-Spektrum des N-Hydroxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthions-(2) (Abb. 4) fehlt die NH-Bande, dafür zeigt die Verbindung bei 3450 cm^{-1} eine ausgeprägte OH-Bande, woraus man schließen kann, daß die Hydroxymethylierung also am Stickstoff erfolgt.

Das IR-Spektrum des entsprechenden Acetylesters schließlich (Abb. 5) zeigt statt der OH-Schwingung eine scharfe Bande im C=O - Schwingungsgebiet bei 1750 cm^{-1}.

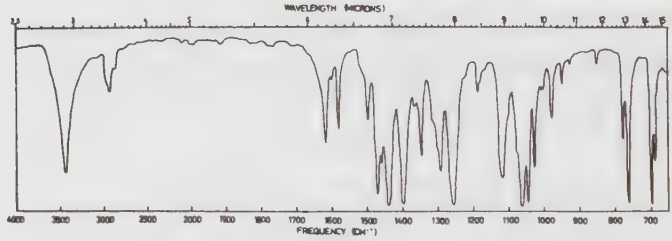


Abb. 4 IR-Spektrum von N-Hydroxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2)

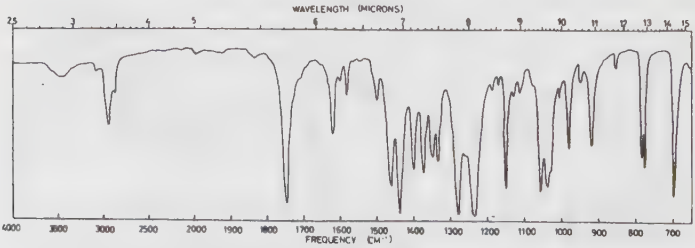


Abb. 5 IR-Spektrum von N-Acetoxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2)

b.) Darstellung der veresterten N-Hydroxymethylverbindungen

Als Säurekomponente zur Veresterung der N-Hydroxymethylverbindungen bot sich zunächst Essigsäure an, die einerseits die gewünschte Stabilisierung der N-Methylolverbindung, andererseits aber auch eine Hydrolyse des Esters im Organismus erwarten ließ. Ferner wurden, im Hinblick auf höhere Stabilität der Ester Benzoe- und Zimtsäure als Anhydride eingesetzt.

Wegen der hohen Labilität der N-Hydroxymethylverbindungen wurde die Veresterung meist bei Zimmertemperatur, in einigen Fällen im siedenden Wasserbad durchgeführt. Stärkeres und längeres Erhitzen führte fast immer zur Zersetzung bzw. verharzten Produkten, oder infolge Formaldehydabspaltung zu N-Acetylderivaten.
Als Lösungsmittel wurde Pyridin verwendet. Bei der Darstellung der Acetylester wurde auf ein Lösungsmittel verzichtet, sofern sich die N-Hydroxymethylverbindung in Acetanhydrid löste.
Bei Estern, die durch Umsetzung der N-Hydroxymethylverbindung mit Acetanhydrid dargestellt wurde, erfolgte die Aufarbeitung in der Weise, daß die entstehende Essigsäure bzw. überschüssiges Acetanhydrid nach Zusatz von Äthanol zwecks Essigesterbildung im Vakuum abdestilliert wurden, und der verbleibende, meist ölige Rückstand durch längeres Aufbewahren im Kühlschrank zur

Kristallisation gebracht wurde.

Die Reinigung der Rohprodukte verlief bei wasserlöslichen Estern meist schwierig und teilweise unter großen Verlusten. Das Umkristallisieren gelang mit dem Lösungsmittelgemisch Äthanol/Petroläther am besten, erfordert aber beim Lösen sehr schonendes Arbeiten und beim Kristallisieren genaues Dosieren der Lösungsmittel, tagelanges Kühlen und Impfen. Mit besseren Ausbeuten verlief die Aufarbeitung der wenig wasserlöslichen Ester: nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz auf Eis gegeben, überschüssige Säurekomponente vom Rohprodukt durch geeignete Lösungsmittel abgetrennt und der Ester aus verschiedenen Lösungsmittelsystemen umkristallisiert.

Trotz schonender Arbeitsweise ließ sich beispielsweise N-Hydroxymethylbenzimidazol nicht acetylieren. Schon beim Lösen der Substanz in eisgekühltem Acetanhydrid trat starker Formaldehydgeruch auf. Nach mehrstündigem Rühren unter Eiskühlung konnte bei der Aufarbeitung praktisch nur das N-Acetylderivat isoliert werden, das im Dünnschichtchromatogramm den gleichen Rf-Wert aufwies, wie das aus Benzimidazol und Acetanhydrid bereitete N-Acetylbenzimidazol. Ähnliche Beobachtungen machte W e r n e r, der Benzimidazol nicht zur Umsetzung mit Formaldehyd und Amin im Sinne einer

Mannich-Reaktion bringen konnte; es wurde lediglich hydroxymethyliert[26].

Als weitere Möglichkeit zur Einführung der Acetylgruppe bot sich die Umsetzung mit Keten an, die einen einheitlichen Verlauf der Reaktion versprach, zumal keine Nebenprodukte entstehen sollten. Im Falle des N-Hydroxymethylbenzimidazols führte die Einwirkung von Keten bei Zimmertemperatur jedoch nicht zum gewünschten Ester; es entstand, wie bei der Umsetzung mit Acetanhydrid, fast ausschließlich N-Acetylbenzimidazol.

Schließlich blieb noch die Umsetzung mit Acetylchlorid bzw. Benzoylchlorid. Die Reaktion mit Benzoylchlorid nach Schotten-Baumann führt unter Aufspaltung des Imidazolringes zur Bildung N,N'-Dibenzoyl-o-phenylendiamin, Formaldehyd und Ameisensäure, eine Reaktion, die in der Literatur als Bamberger-Reaktion beschrieben ist[44,45]. Bei der Umsetzung mit Acetylchlorid wurden zwei Produkte erhalten, die als N-Acetylbenzimidazol und Benzimidazoliumchlorid identifiziert werden konnten[46].

Ebenso widersetzt sich N-Hydroxymethylhydantoin der Acetylierung; es wurden nur ölige Produkte erhalten, die sich weder zur Kristallisation bringen, noch durch Hochvakuumdestillation reinigen ließen. Dagegen liefert N^3-Hydroxymethyl-5,5-diphenylhydantoin bei der

Acetylierung das gewünschte Produkt (vgl. S. 17).

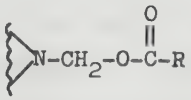
Die Beeinflussung der Reaktivität des Stickstoffs durch andere Substituenten in der Molekel beobachtete man auch bei den Oxdiazolthionen-(2). Das 5-Methylderivat liefert bei der Reaktion mit Formaldehyd ein öliges, nicht kristallisierbares Produkt; das 5-Pyrazylderivat läßt sich hydroxymethylieren, doch führte die anschließende Umsetzung mit Acetanhydrid zu keinem Erfolg; erst die Reaktion mit Benzoesäureanhydrid lieferte in guter Ausbeute den Benzoesäureester. Von der N-Hydroxymethylverbindung des 5-Phenylderivates schließlich konnte der Acetylester kristallin in 66%iger Ausbeute erhalten werden.

Bei der Umsetzung von N-Hydroxymethylimidazolthion-(2) mit Acetanhydrid im Überschuß erhält man ein Produkt, das auf Grund der Analyse zwei Acetylreste enthält, wobei als weitere acetylierbare Stelle im Molekül das Stickstoff- oder das Schwefelatom in Frage kommen kann. Diese zweite, direkt am Heteroatom gebundene Acetylgruppe ist aber wesentlich weniger fest gebunden als die esterartig gebundene Essigsäure; so läßt sie sich durch 24-stündiges Rühren in Wasser bei Zimmertemperatur quantitativ abspalten.

N-Acetoxymethyl-piperidin und -morpholin sind bereits von B o e h m e u. Mitarb. dargestellt worden, und

zwar durch Spaltung der Methylen-bis-amine mit Acetanhydrid[18]. Das dabei gleichzeitig entstehende N-Acetylamin ließ sich jedoch auf Grund der nahe beieinanderliegenden Siedepunkte nur schwer vom Ester trennen, so daß jeweils unreine Produkte erhalten wurden. Führt man die Synthese durch Umsetzung der N-Hydroxymethylamine mit Acetanhydrid durch, indem man das Anhydrid in die N-Methylolverbindung unter Eiskühlung eintropfen läßt, so entsteht fast ausschließlich der Ester, der sich im Vakuum leicht von der Essigsäure und vom überschüssigen Acetanhydrid abtrennen läßt.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß die in dieser Arbeit dargestellten Ester der allgemeinen Struktur



auch als Mannich-Basen formuliert werden können, wobei die Säure als OH-acide Verbindung fungiert, die entweder amino- oder amido-methyliert wird, je nachdem ob man von Basen oder Säureamiden bzw. -imiden ausgeht.

In Tabelle 1 sind die Ausbeuten und die Schmelz- bzw. Siedepunkte der dargestellten Ester zusammengestellt.

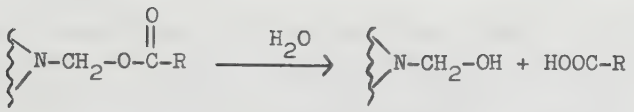
Tabelle 1

Substanz	Ausbeute in %	Schmelz- bzw. Siedepunkt
N-Acetoxymethylpiperidin	74	45-46/0,4 Torr
N-Acetoxymethylmorpholin	74	80-82/1,6 Torr
N-Acetoxymethylsuccinimid	86	51
N-Benzoyloxymethylsuccinimid	64	124-125
N-Acetoxymethylnicotinsäure-amid	62	94 - 95
N-Benzoyloxymethylnicotin-säureamid	47	144-145
N-Acetoxymethylisonicotin-säureamid	46	88 - 89
7-Acetoxymethyltheophyllin	86	165
7-Benzoyloxymethyltheo-phyllin	73	168-169
N^3-Acetoxymethyl-5,5-diphenyl-hydantoin	95,6	151-152
N-Benzoyloxymethylphthalimid	84	108
N-Cinnamoyloxymethylphthalimid	65	143
N^3-Acetoxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2)	66	116-117
N^3-Benzoyloxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2)	67	98-99
N-Acetoxymethyl-N'-(S)-acetyl-imidazolthion-(2)	65,7	114
N-Acetoxymethyl-imidazol-thion-(2)	73,5	126-128
N,N'-Bis(acetoxymethyl)-imida-zolthion-(2)	61	120-121
N-Acetoxymethyl-4-tert.-butyl-imidazolthion-(2)	71,5	188
N,N'-Bis(acetoxymethyl)-benz-imidazolthion-(2)	57,2	154-155

c.) Stabilität der Ester in wäßriger Lösung

Im Hinblick auf die in der Einleitung gegebene Fragestellung war nun zu klären, wie stabil sich die hergestellten Ester in wäßrigem, annähernd neutralem Milieu verhalten würden.

Ester der vorstehend beschriebenen Art neigen in wäßrigem Milieu zum Zerfall in Säure und N-Hydroxymethylverbindung:

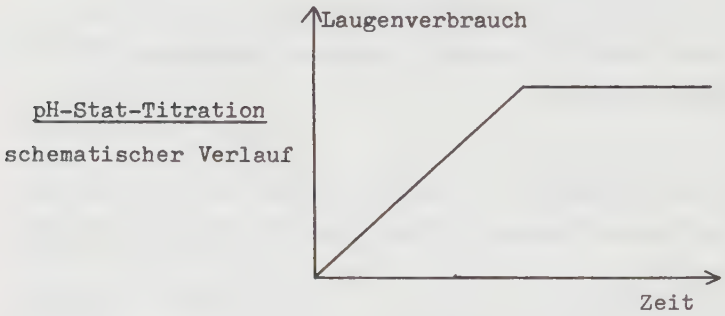


Als Maß für die Hydrolyse kann der Laugenverbrauch gewertet werden, der zur Neutralisation der fortlaufend entstehenden Säure notwendig ist. Der Laugenverbrauch wird über eine Syringe gesteuert, die an einen pH-Staten: Ole Dich Nr. 21, Titrator Tap TTT 1a, Firma Radiometer, Kopenhagen angeschlossen ist.

Durchführung der Bestimmung:

10 ml einer 10^{-3} molaren Lösung des jeweiligen Esters in 0,1 n Kaliumchloridlösung werden auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Das Reaktionsgefäß wird auf 37° C thermostatisiert. Die im Laufe der Zeit freiwerdende Säure wird durch automatische Zugabe von 0,1 n Natronlauge ständig neutralisiert, so daß der eingestellte pH-Wert stets erhalten bleibt. Der Laugenverbrauch wird gegen die Zeit aufgezeichnet; gegen Ende der Hydrolyse

hört die Säurebildung auf, damit auch der Laugenverbrauch, so daß sich schematisch folgendes Bild ergibt:



Um einen Hinweis auf die Stabilität der Ester zu bekommen, wurden die Messungen zunächst bei pH 9,0 durchgeführt, wobei natürlich stärkere Hydrolyse als beim pH 7,4 zu erwarten ist. Bei pH 9,0 wurde zur Ausschaltung des Luft-CO_2 Einflusses unter Stickstoff gearbeitet. Dabei ergab sich für das N-Acetoxymethylsuccinimid folgender Kurvenverlauf:

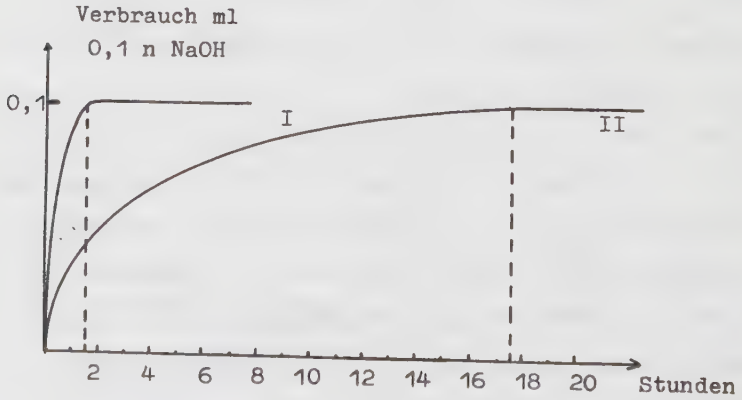


Abb. 6 Zerfallskurven von N-Acetoxymethylsuccinimid
I bei pH 9,0
II bei pH 7,4

Während die Hydrolyse bei pH 9,0 nach etwa 90 Minuten beendet ist, werden zum Ablauf derselben Reaktion bei 7,4 17 1/2 Stunden benötigt.

Stabiler erweist sich der Benzoesäureester des N-Methylolsuccinimids: Zur Totalhydrolyse sind bei pH 9,0 4 1/2 Stunden notwendig; bei pH 7,4 wurde die Reaktion nach 24 Stunden abgebrochen, nachdem erst 50% des theoretischen Laugenverbrauchs erreicht waren. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit wurden hier wie bei verschiedenen anderen Estern wechselnde Mengen Dioxan (10 - 25%) zugesetzt. In Parallelversuchen mit wasserlöslichen Estern wurde festgestellt, daß Dioxan in diesen Konzentrationen keine nennenswerte pH-Verschiebung bewirkt.

Entsprechende Vergleiche über den Einfluß der Säurekomponente auf die Stabilität der Ester konnten auch mit dem N-Benzoyloxymethyl- und N-Cinnamoyloxymethylphthalimid angestellt werden. Der Benzoesäureester ist bei pH 9 nach 90 Minuten, bei pH 7,4 nach 16 1/2 Stunden zerfallen, entsprechend nach 3 bzw. 30 Stunden der Zimtsäureester, d.h. Zimtsäure verlängert im Vergleich zur Benzoesäure die Zerfallszeit um etwa das Doppelte.

Stabiler als die bisher genannten Verbindungen verhalten sich die Oxdiazolthion-(2)-derivate:

Das N^3-Acetoxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2) benötigt zum Zerfall bei pH 9,0 14 Stunden, das N^3-Benzoyloxymethyl-5-pyrazylderivat beim selben pH-Wert rund 16 Stunden; die Hydrolyse bei pH 7,4 dauert für beide Verbindungen sogar mehrere Tage.

Ähnlich verhalten sich die Imidazolthion-(2)-verbindungen. Bei pH 9,0 nimmt der Zerfall des 1-Acetoxymethyl-imidazolthions-(2) 16 Stunden, der des 1,3-Bis(acetoxymethyl)-imidazolthions-(2), bei dem doppelter Laugenverbrauch erwartet werden muß, 55 Stunden in Anspruch. Die Messung bei pH 7,4 wurde bei beiden Verbindungen nach mehreren Tagen abgebrochen, beispielsweise waren vom Diester nach 104 Stunden erst 50% zerfallen.

Ein von allen bisher genannten Verbindungen abweichendes Verhalten zeigen die Nicotin- und Isonicotinsäurederivate. Schon beim Lösen in Wasser tritt starke Spontanhydrolyse auf, so daß bereits bei Beginn der Messung über 50% des theoretischen Laugenverbrauchs erreicht sind.

N-Acetoxymethyl-piperidin und -morpholin lassen sich in bezug auf ihre Stabilität mit der pH-Stat-Methode nicht erfassen; bei der Hydrolyse entstehen neben Essigsäure die basisch reagierenden N-Hydroxymethylverbindungen, so daß hier keine pH-Änderung der zu untersuchenden Lösung eintritt.

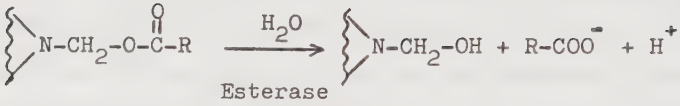
Diese Befunde zeigen, daß die Ester eine recht unterschiedliche Stabilität besitzen, in wäßriger Lösung also verschieden schnell in Säure und N-Methylolverbindung zerfallen; aromatische Säuren, wie Benzoe- und Zimtsäure bewirken eine Stabilitätserhöhung. Berücksichtigt man jedoch, daß die Ester im Organismus einer weiteren Hydrolyse durch Esterasen unterliegen, so besitzen die gemessenen Zerfallszeiten nur bedingte Aussagekraft hinsichtlich der Freisetzung der cytostatisch wirksamen N-Hydroxymethylverbindung.

d.) Stabilität der Ester gegenüber Rattenleber- und Mäuseasciteshomogenaten

Um festzustellen, ob die dargestellten Ester im Organismus einer Hydrolyse durch Esterasen unterliegen, wurden die Substanzen mit Zellhomogenaten inkubiert, die eine hohe Esteraseaktivität erwarten ließen. Verwendet wurden Homogenate von Rattenleberzellen sowie von Ehrlich-Ascitestumorzellen der Maus, da bei intraperitonealer Applikation eine Spaltung der Ester durch Ascitesesterasen angenommen werden kann.

Zur Messung der durch Esteraseaktivität freigesetzten Säure bot sich die Warburg-Technik an[27,28].

Die nach der Gleichung



entstehenden Protonen reagieren mit Hydrogencarbonationen unter Kohlendioxydentwicklung, die fortlaufend verfolgt werden kann.

Die am pH-Staten am schnellsten zerfallende Substanz N-Acetoxymethylsuccinimid zeigt das in Abb. 7 dargestellte Verhalten. Die bereits durch Wasser verhältnismäßig rasch hervorgerufene Hydrolyse (Kurve I) wird nach Inkubation mit Leber- und Asciteszellen noch verstärkt, wobei Leberhomogenat gegenüber Asciteszellen eine höhere Esteraseaktivität besitzt.

Zu einer gegenüber wäßrigem Milieu verstärkten Hydrolyse führt auch die Einwirkung von Leberhomogenat auf N-Benzoyloxymethylsuccinimid (Abb. 8); die Kohlendioxydfreisetzung erfolgt allerdings langsamer als beim Acetylester. Dagegen zeigen Asciteszellen gegenüber dem Kontrollwert in Wasser keinen nennenswerten Effekt.

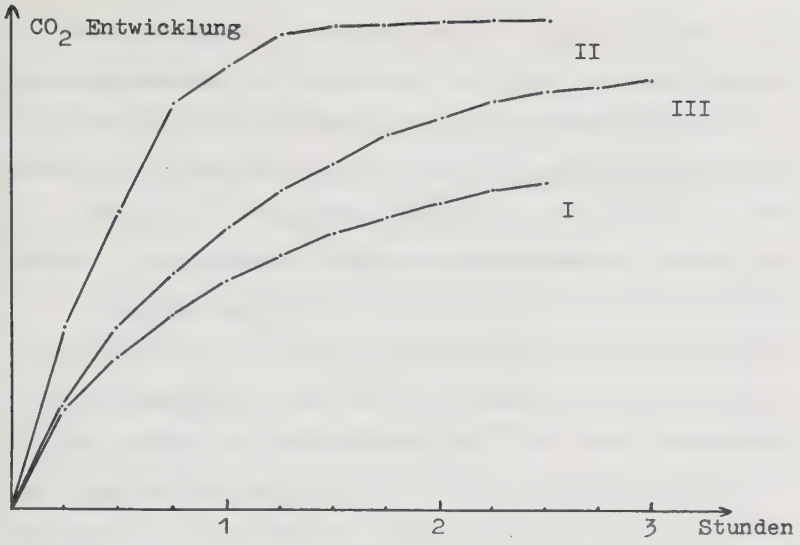


Abb. 7 Zerfallskurve von N-Acetoxymethylsuccinimid

I in wäßrigem Milieu
II nach Einwirkung von Leberhomogenat
III " " " Asciteshomogenat

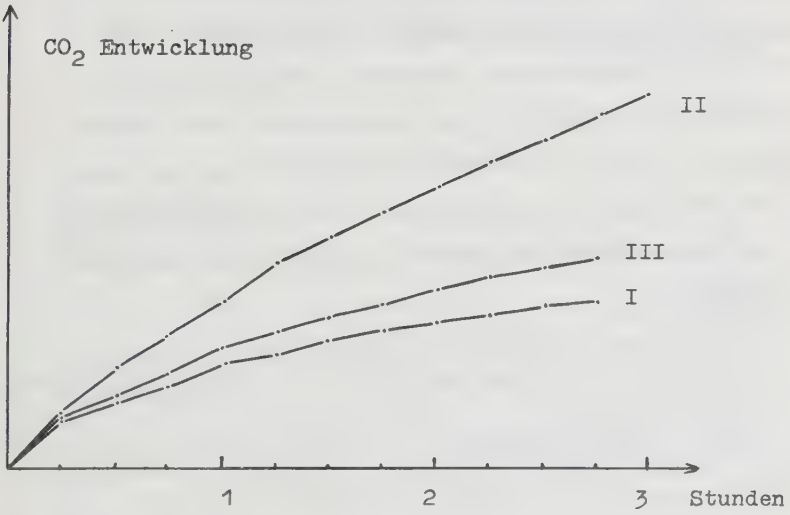


Abb. 8 Zerfallskurve von N-Benzoyloxymethylsuccinimid

Die bereits nach der pH-Stat-Methode festgestellten Unterschiede in bezug auf die durch die Säurekomponente hervorgerufene Stabilität der Ester lassen sich bei den Phthalimidderivaten auch in den biologischen Stabilitätsmessungen deutlich nachweisen. Während die Inkubation von Benzoyloxymethylphthalimid mit Leberzellen zu einer gegenüber der Kontrolle erheblichen Freisetzung der N-Hydroxymethylverbindung führt (Abb. 9), ruft die Einwirkung desselben Homogenats auf den entsprechenden Zimtsäureester (Abb. 10) fast keine Hydrolyse hervor. Nahezu wirkungslos bleibt auch der Einfluß von Asciteshomogenat auf die Stabilität der beiden Verbindungen; im Falle des Benzoesäureesters wurde eine kaum stärkere Kohlendioxydentwicklung beobachtet als bei der Kontrolle in Wasser.

Auffällig ist der Einfluß der Zellhomogenate auf die Oxdiazolthion-(2)-verbindungen. Das in Wasser sehr stabile N^3-Acetoxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2) erfährt nach Inkubation mit Leberzellen eine starke Hydrolyse (Abb. 11); eine geringere Wirkung auf diese Verbindung haben Asciteszellen, doch ist die Kohlendioxydentwicklung noch wesentlich höher als beim Kontrollwert.

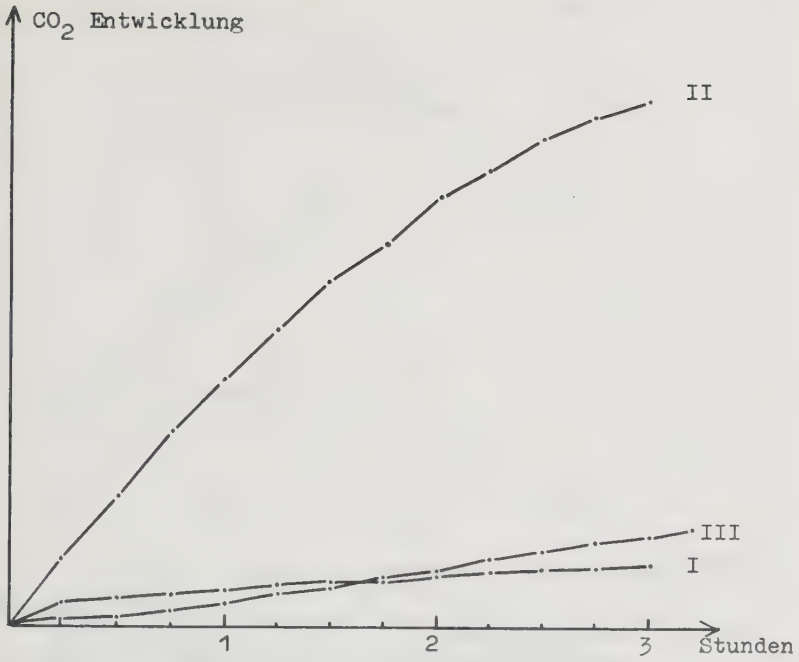


Abb. 9 Zerfallskurve von N-Benzoyloxymethylphthalimid

I Kontrollwert in wäßriger Lösung
II nach Einwirkung von Leberhomogenat
III " " " Asciteshomogenat

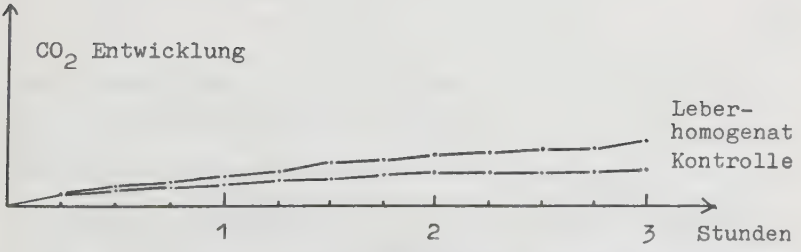


Abb. 10 Zerfallskurve von N-Cinnamoyloxymethylphthalimid

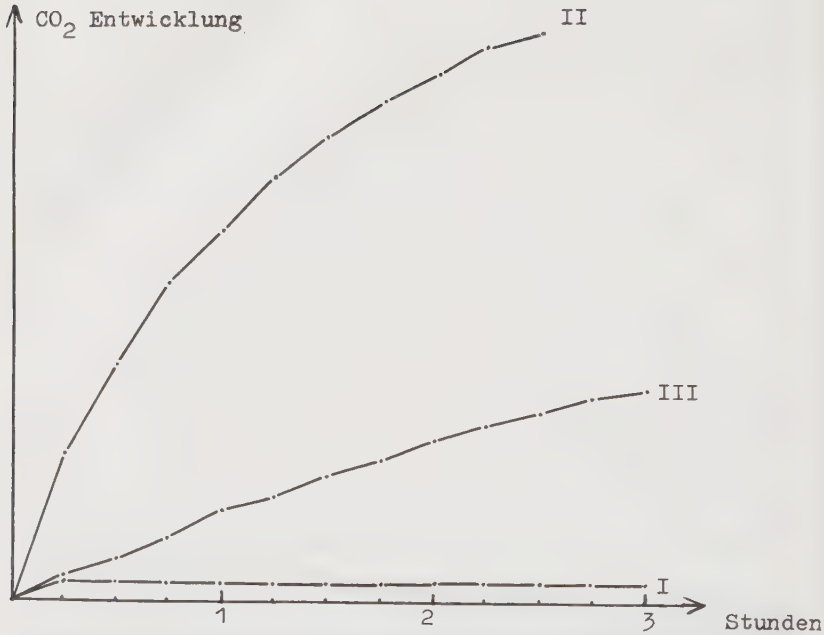


Abb. 11 Zerfallskurve von N-Acetoxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2)

I Kontrollwert in wäßriger Lösung
II nach Einwirkung von Leberhomogenat
III " " " Asciteshomogenat

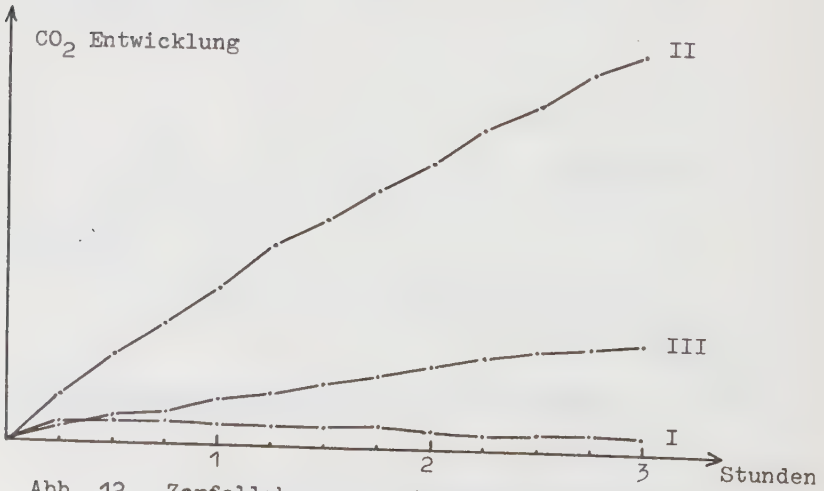


Abb. 12 Zerfallskurve von N-Benzoyloxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2)

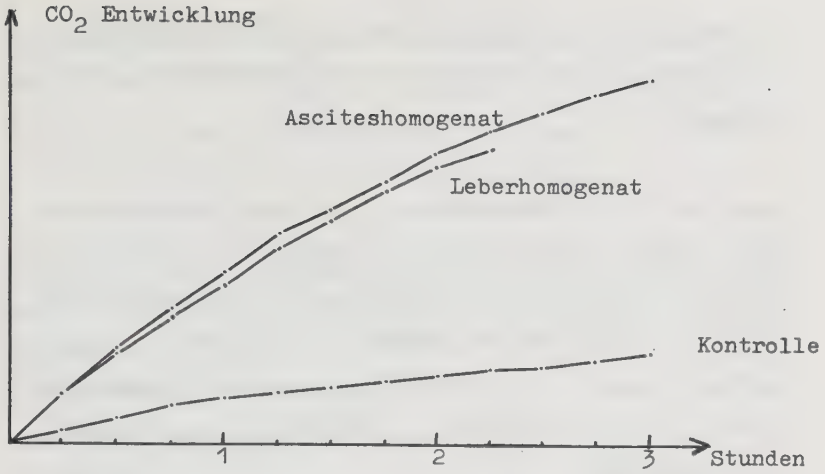


Abb. 13 Zerfallskurve von N,N'-Bis(acetoxymethyl)-imidazolthion-(2)

Stabiler als die letztgenannte Substanz verhält sich N-Benzoyloxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2) gegenüber Leberesterasen (Abb. 12); die Freisetzung der N-Hydroxymethylverbindung erfolgt langsamer als beim 5-phenylsubstituierten Derivat. Noch langsamer, und gegenüber der Kontrolle nur unwesentlich erhöht, ist die Hydrolyse nach Einwirkung von Asciteshomogenat.

Ein abweichendes Verhalten zeigt das N,N'-Bis(acetoxymethyl)-imidazolthion-(2) (Abb. 13); während in den bisherigen Messungen Leberzellen stets eine höhere Esteraseaktivität als Asciteszellen aufwiesen, zeigt diese Verbindung in ihrer Stabilität gegenüber den beiden Zell-

homogenaten keine Unterschiede; beide Medien führen in hohem Maße zur Freisetzung der Bis(hydroxymethyl)verbindung.

Wenn auch die Warburgtechnik in der hier beschriebenen Weise keine streng quantitative Aussage über die Stabilität der Ester zuläßt (Pufferkapazität des Homogenats, CO_2-Verlust beim Thermostatisieren), so gibt sie doch die Tendenz wieder, wie sich die Verbindungen im Organismus in bezug auf die Freisetzung der N-Hydroxymethylverbindung verhalten.

Stabilitätsmessungen nach der eben beschriebenen Methode waren beim Acetoxymethyl-piperidin und -morpholin nicht möglich, da die bei der Hydrolyse entstehenden stark basischen N-Hydroxymethylverbindungen eine Kohlendioxydfreisetzung verhindern.

Um auch diese Verbindungen auf ihre Stabilität zu untersuchen, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das Verhalten dieser Substanzen gegenüber Zellen hoher Esteraseaktivität zu untersuchen.

Hier bot sich die Hydroxamatreaktion an: Im Gegensatz zu freien Säuren reagieren Ester mit Hydroxylamin unter Bildung von Hydroxamsäuren, die mit Eisen(III)-chlorid eine intensiv rote Farbreaktion geben; unter dem Einfluß

von Esterasen und dem damit verbundenen verstärkten Auftreten der freien Säure ist demnach ein Verschwinden der roten Farbe des Eisen-Hydroxamat-Komplexes zu erwarten, was photometrisch gemessen werden kann[29].

Die Inkubation von N-Acetoxymethyl-piperidin mit Rattenleberhomogenat führt zu dem in Abb. 14 dargestellten Verhalten:

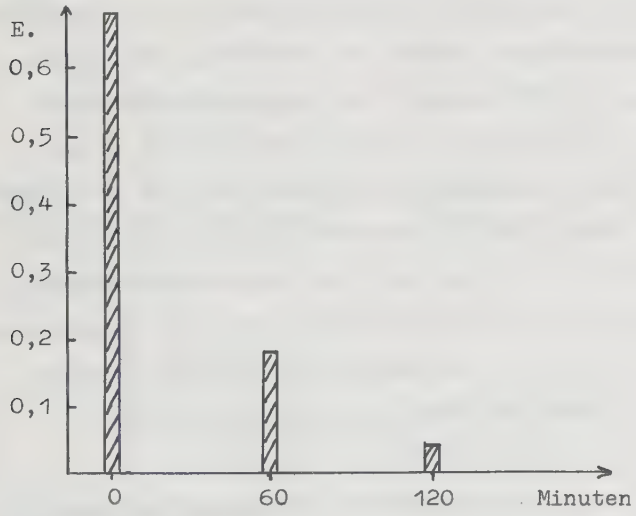


Abb. 14 Extinktion des Eisen-Hydroxamat-Komplexes nach Einwirkung von Rattenleberhomogenat auf N-Acetoxymethylpiperidin

Zu Beginn des Versuches (Zeitpunkt 0) zeigt der Komplex eine Extinktion von 0,68, die nach 1 Stunde auf 0,18, nach 2 Stunden auf 0,04 sinkt. Folglich unterliegt auch

diese Verbindung - ein ähnliches Verhalten ist vom N-Acetoxymethylmorpholin zu erwarten - einer starken Hydrolyse durch Esterasen des Leberhomogenates.

e.) Einwirkung der Ester auf das Mäuseascitescarcinom (Ehrlich) in vitro

Einen Einblick in die intrazellulären Angriffspunkte alkylierend wirkender Cytostatica vom Typ der N-Hydroxymethylverbindungen liefert die Bestimmung der Einbauraten von C-14 Thymidin, C-14 Uridin und C-14 Leucin in Ascitestumorzellen in vitro. Verminderter Einbau der radioaktiv markierten Vorstufen läßt auf eine Hemmung der DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese schließen. Da zu erwarten ist, daß nur die freien N-Hydroxymethylverbindungen, nicht aber die intakten Ester cytostatisch wirken, dürften die Einbauraten umso stärker gehemmt werden, je mehr der Ester zur Hydrolyse neigt.

Abb. 15 zeigt die Wirkung von N-Hydroxymethylpiperidin auf den Einbau von C-14 markiertem Thymidin, Uridin und Leucin in einer Ascites-Zellsuspension. Während der zweistündigen Inkubation kommt es bereits nach 30 Minuten zu einer nahezu totalen Hemmung des Einbaus der Nucleoside. In Abb. 16 sind die Versuche mit dem Ester N-Acetoxymethylpiperidin dargestellt. Die Hemmung tritt

Hemmung der Einbauraten von C-14 Thymidin ————
C-14 Uridin - - - - - - -
C-14 Leucin .....
bei Ascitestumorzellen nach Einwirkung von:

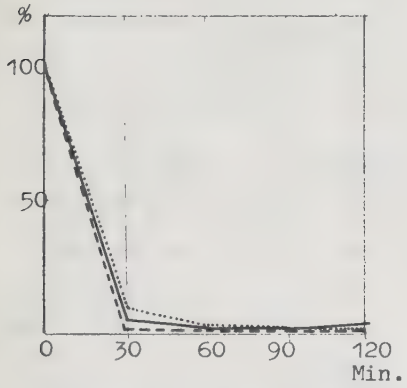


Abb. 15
N-Hydroxymethylpiperidin
10^{-3} m

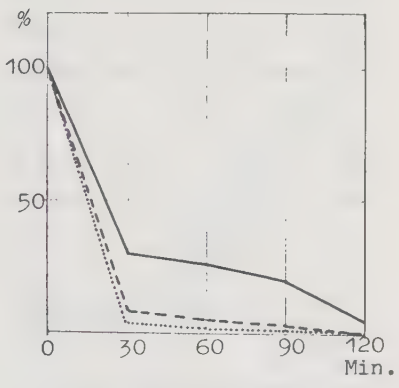


Abb. 16
N-Acetoxymethylpiperidin
10^{-3} m

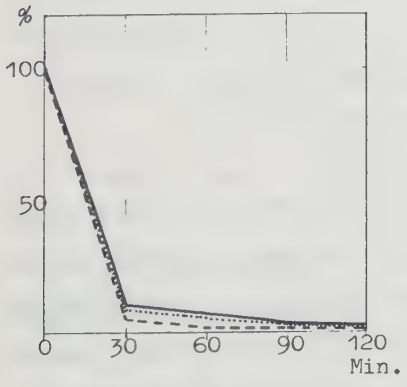


Abb. 17
N-Hydroxymethylsuccinimid
10^{-3} m

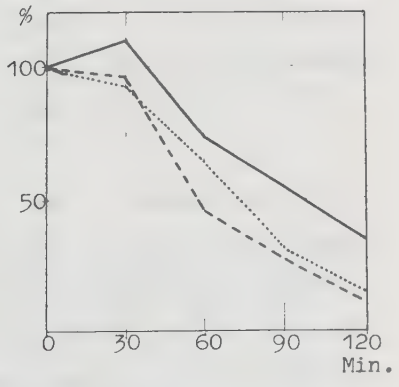


Abb. 18
N-Acetoxymethylsuccinimid
10^{-3} m

Hemmung der Einbauraten von C-14 Thymidin ————
C-14 Uridin - - - - - - - -
C-14 Leucin .....

bei Ascitestumorzellen nach Einwirkung von:

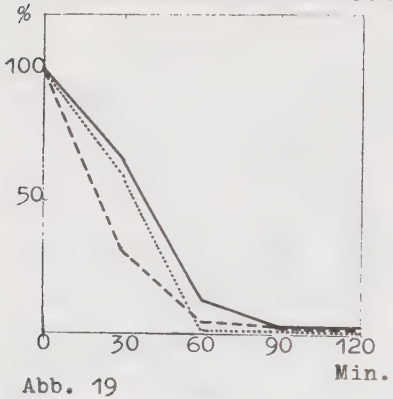


Abb. 19
N-Hydroxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2) 5×10^{-4} m

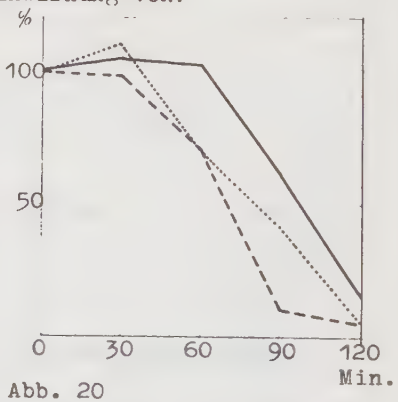


Abb. 20
N-Acetoxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2) 5×10^{-4} m

hier nicht so rasch ein, da die wirksame N-Hydroxymethyl-verbindung erst hydrolytisch freigesetzt werden muß. Während beim Uridin- und Leucin Einbau keine Unterschiede zur freien Verbindung auftreten, sinkt der Thymidineinbau nach 30 Minuten nur bis auf 30% der Kontrolle; erst nach 2 Stunden kommt es zur Hemmung unter 10%.

In den Abbildungen 17 und 18 ist das Verhalten von N-Hydroxymethylsuccinimid und des entsprechenden Acetylesters dargestellt. Während die freie Verbindung schon nach 30 Minuten eine Senkung der Einbauraten auf unter 10% der Kontrolle zeigt, tritt die Hemmwirkung beim Ester sehr zögernd ein; ausgeprägte Hemmeffekte sind erst nach 2 Stunden festzustellen.

Ähnlich liegen die Verhältnisse beim N^3-Hydroxymethyl- und N^3-Acetoxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2) (Abb. 19 u. 20). Zwar ist beim Ester nach 120 Minuten eine nahezu totale Blockierung der DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese zu beobachten, doch tritt die Hemmung in derselben Größenordnung bei der freien N-Hydroxymethylverbindung bereits nach 60 Minuten auf. Keine prinzipiellen Unterschiede zeigen die Diagramme der Mono- und Bis(hydroxymethyl)-imidazolthione-(2) sowie der entsprechenden Ester, so daß auf eine Wiedergabe hier verzichtet werden kann.

Anders gestalten sich die Dinge beim N^3-Benzoyloxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2); die freie Verbindung führt schon nach 30 Minuten zu einer ausgeprägten Senkung des Thymidin-, Uridin- und Leucineinbaus (Abb. 21); dagegen läßt der Benzoylester auch nach 120 Minuten keinerlei Hemmeffekte erkennen (Abb. 22). Der Grund für dieses Verhalten dürfte in der außerordentlich hohen Stabilität des Esters liegen; in den vorhergehenden Versuchen kam es weder in wäßrigem Milieu, noch unter Einwirkung von Ascitesesterasen zu einer merklichen Hydrolyse.

Dieselben Beobachtungen werden auch bei den Estern des N-Hydroxymethylphthalimids gemacht, die in den vergleichbaren Stabilitätsmessungen keinerlei Tendenz zur Hydrolyse zeigten. Der sofortigen Hemmung der Einbauraten

Hemmung der Einbauraten von C-14 Thymidin ————
C-14 Uridin - - - - - -
C-14 Leucin .....
bei Ascitestumorzellen nach Einwirkung von:

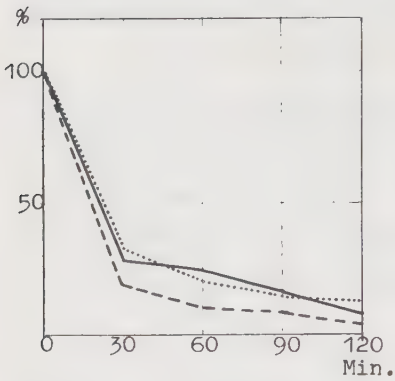


Abb. 21
N-Hydroxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2) 10^{-3} m

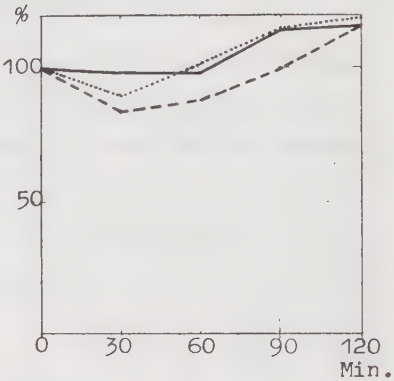


Abb. 22
N-Benzoyloxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2) 10^{-3} m

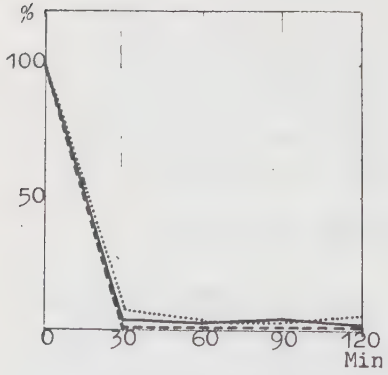


Abb. 23
N-Hydroxymethylphthalimid 10^{-3} m

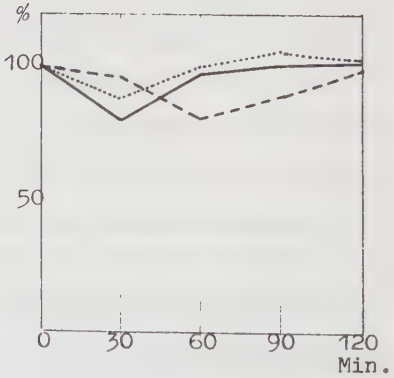


Abb. 24
N-Benzoyloxymethylphthalimid 10^{-3} m

nach Einwirkung der freien N-Hydroxymethylverbindung steht der nahezu ungehemmte Einbau der drei Metaboliten nach Einwirkung der Ester gegenüber (Abb. 23 u. 24).

Diese Befunde erhärten die eingangs geäußerte Vermutung, daß nicht die Ester, sondern nur die freien N-Hydroxymethylverbindungen cytostatische Wirkungen entfalten und die Ester nur in dem Maße wirksam werden, wie sie im Organismus in die N-Methylolkomponenten hydrolysieren.

Zwar gibt die Hemmung der Einbauraten Hinweise über die Hemmung der DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese, doch ist damit noch nichts über die eigentlichen Angriffspunkte der N-Hydroxymethylverbindungen gesagt. Auf Grund ihrer Struktur sind sie zur Aminoalkylierung der verschiedenen H-aciden Gruppen innerhalb der Nucleinsäuren befähigt, so daß eine intra- und intermolekulare Vernetzung der DNS-Stränge angenommen werden kann; damit ist also der primäre Angriffspunkt alkylierend wirkender Cytostatika in einer Beeinflussung des Nucleinsäurestoffwechsels zu suchen[30,31,32]. Nach neuesten Untersuchungen von W e i t z e l u. Mitarb.[33] führt nun die Vernetzung der DNS-Stränge zu einer Hemmung der primer-Funktion der DNS für die DNS-abhängigen Polymerasen, insbesondere der DNS-Polymerase sowie der DNS-abhängigen RNS-Polymerase. Die Annahme der Blockierung der DNS-Matrize machte auch die Beobachtung verständlich, daß verschiedene Hemm-

substanzen schon in sehr geringer Dosierung wirksam werden, daß beispielsweise von dem schwer wasserlöslichen N^3-Hydroxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2) die minimal gelöste Menge zur Hemmung des Ascitestumswachstums ausreicht.

Eine starke enzymblockierende Wirkung besitzt der durch Zerfall von N-Hydroxymethylverbindungen entstehende Formaldehyd; daher bleibt Formaldehyd bei einer Dosierung unter 10^{-5} m auch wirkungslos. Bei instabilen N-Hydroxymethylverbindungen wie N-Hydroxymethylsuccinimid sind mit Hilfe der in der o.a. Arbeit beschriebenen Methoden die Wirkungen der intakten Verbindung von der des Formaldehyds deutlich abzugrenzen.

Die Hemmung der Nucleosid-Einbauraten läßt auch die Annahme zu, daß stark lipophile Verbindungen, wie die Oxdiazolthione, sich an Zellmembranen anlagern, damit den Eintritt von Nucleosiden in die Zelle hemmen und zu einem Absinken der Einbauraten führen, eine Erscheinung, die man als Membraneffekt bezeichnet. Auf Grund der Tatsache, daß z.B. N-Hydroxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2) eine starke Einbauhemmung hervorruft, der ebenso lipophile Benzoylester dagegen nicht, ist ein Membraneffekt bei dieser Verbindung auszuschließen.

f.) Einwirkung der Ester auf das Mäuseascitescarcinom in vivo

Bei der Prüfung der synthetisierten Ester am Mäuse-Ascitescarcinom war zu erwarten, daß die stark zur Hydrolyse neigenden Verbindungen auch eine maximale Hemmung des Asciteswachstums und damit Parallelen zu den Einbauversuchen zeigen würden.

In Tabelle 2 sind die mit N-Hydroxymethylverbindungen und deren Estern erzielten Ergebnisse an der Ascitesmaus zusammengestellt.
Wie man daraus entnehmen kann, sind die freien N-Hydroxymethylverbindungen in nichttoxischer Dosierung hochwirksam und in der Lage, das Mäuseascitescarcinom nach 10 Tagen völlig zur Rückbildung zu bringen. Bei den Estern muß man, um eine Wirkung zu erzielen, durchweg höher dosieren. Der Grund liegt darin, daß aus den unwirksamen Estern erst allmählich die wirksame Verbindung freigesetzt wird. Mit der Erhöhung der Dosis der Ester kommt man oft in toxische Bereiche. Diese Toxizitätsunterschiede blieben bei den Einbauversuchen unberücksichtigt, so daß ein im Einbauversuch wirksamer Ester im Tierversuch infolge zu hoher Toxizität in der maximal möglichen Dosierung keine so ausgeprägte Wirkung entfalten kann.

Auffällig ist das Verhalten des N-Acetoxymethylsuccinimids: 10 mg pro Maus und Tag führen nur zu einem

Tabelle 2

Prüfung von N-Hydroxymethylverbindungen und deren Estern am Ascitescarcinom der Maus. Kontrolle = 100%

(Methodik s. l. c. 47)

Substanz	Dosis p. Maus u. Tag i.p.	Werte am 11. Versuchstag		
		Ascitesmenge in % der Kontrolle	überlebende Tiere von 11	davon mit Ascites
N-Hydroxymethylpiperidin	2 mg	0	10	0
N-Acetoxymethylpiperidin	5 mg	17	10	4
N-Hydroxymethylmorpholin	5 mg	1	11	1
N-Acetoxymethylmorpholin	4 mg	19	10	4
N-Hydroxymethylsuccinimid	7 mg	0	11	0
N-Acetoxymethylsuccinimid	10 mg	64	9	9
N-Hydroxymethylimidazolthion-(2)	10 mg	0	7	0
N-Acetoxymethylimidazolthion-(2)	10 mg	16	4	4
N,N'-Bis(hydroxymethyl)-imidazolthion-(2)	3 mg	0	11	0
N,N'-Bis(acetoxymethyl)-imidazolthion-(2)	5 mg 10 mg	36 0	10 3	10 0
N-Hydroxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2)	7 mg	0	11	0
N-Acetoxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2)	7 mg 10 mg	3 0	10 11	3 0
N-Hydroxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2)	5 mg	0	11	0
N-Benzoyloxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2)	5 mg 10 mg	72 62	11 9	11 9

Absinken der Ascitesmenge auf 64% der Kontrolle. Diese Substanz zeigte aber in den vorangegangenen Stabilitätsmessungen eine starke Tendenz zur Hydrolyse und damit zur Freisetzung des hochwirksamen N-Hydroxymethylsuccinimids. Eine Erklärung findet dieses Verhalten in der Tatsache, daß die nach und nach in kleinen Mengen freigesetzte N-Methylolverbindung auf Grund ihrer guten Löslichkeit rasch aus der Peritonealhöhle abtransportiert und ausgeschieden bzw. metabolisiert wird. Von der freien Verbindung dagegen wird jeweils auf einmal die zur Hemmung des Asciteswachstums erforderliche Dosis direkt in den Wirkort appliziert.

Der kaum angedeutete cytostatische Effekt des N-Benzoyloxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthions-(2) überrascht dagegen wenig, da sich diese Substanz in wäßrigem Milieu und gegenüber Asciteszellen sehr stabil verhielt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die hier gemachten Beobachtungen, wonach die Ester gegenüber den freien N-Hydroxymethylverbindungen eine verminderte Wirkung erkennen lassen, sich mit den vorstehend beschriebenen Stabilitätsmessungen und Einbauversuchen decken, die ja auf eine verzögerte Freisetzung der freien Verbindung hindeuteten.

4. Beschreibung der Versuche

Allgemeines:

Analysen:

Die Analysen wurden im Physiologisch-chemischen Institut der Universität unter Leitung von Frau Dr. Anna-Maria Fretzdorff ausgeführt.

Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach der Methode von D u m a s. Die Schwefelbestimmung erfolgte durch Veraschung nach S c h ö n i n g e r[48], die Sulfatbestimmung durch Leitfähigkeitsmessung nach P f u n d t.[49]

Schmelzpunkte:

Alle Schmelz- oder Zersetzungspunkte wurden mit dem Apparat nach Tottoli der Firma Büchi, Schweiz, ermittelt und sind unkorrigiert angegeben.

IR-Spektren:

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte in KBr-Preßlingen im Modell 21 der Firma Perkin-Elmer.

NMR-Spektren:

Die NMR-Spektren wurden mit dem NMR-Spektrometer A 60 (Varian) im Chemischen Institut der Universität Tübingen aufgenommen. Dimethylsulfoxid diente als Lösungsmittel, Tetramethylsilan (TMS) als innerer Standard. Herr Doz. Dr. H. Suhr war bei der Interpretation der Spektren in dankenswerter Weise behilflich.

Dünnschichtchromatographie:[34,35]

Es wurde mit der Desaga-Grundausrüstung chromatographiert. Die verwendeten Trägerplatten von 20 x 20 cm

wurden nach dem Beschichten mit Kieselgel HF_{254} "Merck" 12 Stunden an der Luft und anschließend 20 Minuten bei 110° im Trockenschrank getrocknet. Die Schichtdicke betrug 0,25 mm.

Die Substanzen wurden 2 cm vom unteren Rand als etwa 2%ige Lösungen in geeigneten Lösungsmitteln aufgetragen. Die jeweiligen Fließmittel sind bei den einzelnen Versuchsbeschreibungen angegeben; die Sichtbarmachung erfolgte nach Abdunsten des Lösungsmittels durch Fluoreszenslöschung unter der UV-Lampe. Die angegebenen Rf-Werte sind Mittelwerte von mindestens 3 Chromatogrammen.

a.) Präparativer Teil

N-Hydroxymethylpiperidin[20)]

56,5 ml (0,75 Mol) 36%ige Formalinlösung wurden unter Eiskühlung und Rühren tropfenweise mit 63,86 g (0,75 Mol) Piperidin versetzt. Gegen Ende der Zugabe wurde das Gemisch trübe. Nach 15 Minuten wurde zur Abscheidung des Produktes mit wasserfreiem Kaliumcarbonat gesättigt, rasch abgesaugt und das Filtrat im Scheidetrichter getrennt. Die ölige Epiphase wurde zweimal mit Kaliumcarbonat getrocknet. Alle Arbeiten wurden bei 0° ausgeführt.

Das erhaltene Öl ist mit Wasser nicht mischbar, in organischen Lösungsmitteln gut löslich und muß im Eisschrank aufbewahrt werden. Bei längerem Stehen bei Zimmertemperatur, stärker beim Erhitzen, tritt Gelbfärbung und starker Formaldehydgeruch auf. Beim Versuch, das Öl durch Destillation im Vakuum zu reinigen, trat unter Formaldehydfreisetzung Zersetzung ein.

Ausbeute: 62 g = 71,8% der Theorie

Analyse: ber. für $C_6H_{13}NO$ MG: 115,18

Ber.: 12,17% N Gef.: 12,45% N

N-Acetoxymethylpiperidin

Zu 5,75 g (0,05 Mol) N-Hydroxymethylpiperidin läßt man unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß 5,1 g (0,05 Mol)

Acetanhydrid zutropfen, wobei sich das Reaktionsgemisch erwärmt; bei zu starker Erwärmung wird mit Leitungswasser gekühlt. Das Gemisch wird im Vakuum destilliert und die bei 45 - 46°/0,4 Torr übergehende Fraktion aufgefangen. Man erhält eine farblose stechend riechende, mit Wasser mischbare, ölige Flüssigkeit, die nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur eine gelblich-rosa Färbung annimmt.

Ausbeute: 5,8 g = 74% der Theorie

Analyse: ber. für $C_8H_{15}NO_2$ MG: 157,22

Ber.: 8,90% N Gef.: 8,84% N

N-Hydroxymethylmorpholin[1)]

26,1 g (0,3 Mol) Morpholin werden tropfenweise unter fortwährendem Rühren und Kühlen im Eis/Kochsalzbad mit 23 ml (0,3 Mol) 36%iger Formalinlösung versetzt; 15 Minuten nach beendeter Formaldehydzugabe wird mit wasserfreiem Kaliumcarbonat gesättigt, wobei sich 2 Schichten bilden. Die obere ölige Schicht wird nochmals mit Kaliumcarbonat behandelt, anschließend in Äther aufgenommen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Äthers hinterbleibt ein schwach nach Formaldehyd riechendes Öl, das im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Beim Stehen bei Zimmertemperatur trat im Laufe der Zeit unter Formaldehydabspaltung Zersetzung ein, ebenso bei dem Versuch, das Öl durch Vakuumdestillation (60°/1 Torr)

zu reinigen.

Ausbeute: 30,1 g = 86% der Theorie

Analyse: ber. für $C_5H_{11}NO_2$ MG: 117,15

Ber.: 11,96% N Gef.: 11,90% N

N-Acetoxymethylmorpholin

In 5,85 g (0,05 Mol) N-Hydroxymethylmorpholin läßt man unter Rühren bei Zimmertemperatur 5,1 g (0,05 Mol) Acetanhydrid eintropfen. Bei zu starker Erwärmung des Reaktionsgemisches wird mit Eiswasser von außen gekühlt. Das entstehende Öl wird im Vakuum destilliert. Die bei 80 - 82°/1,5 Torr übergehende Fraktion wird gesondert aufgefangen und stellt den Ester dar. Bei Erhöhung der Temperatur geht N-Acetylmorpholin über.

Ausbeute: 5,5 g = 74% der Theorie

Analyse: ber. für $C_7H_{13}NO_3$ MG: 159,19

Ber.: 8,80% N Gef.: 8,96% N

N-Hydroxymethylsuccinimid[9)]

10 g (0,1 Mol) Succinimid werden in 10 ml (0,1 Mol) siedender Formaldehydlösung (36%) unter Zusatz von Kaliumcarbonat bis zur schwach alkalischen Reaktion gelöst. Die Lösung wird nach Abkühlen im Vakuum eingedampft, bis ein fester Rückstand hinterbleibt. Dieser wird zunächst auf Tonplatten aufgestrichen und nach 24 Stunden

im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Substanz muß unter Feuchtigkeitsschutz aufbewahrt werden.

Ausbeute: 8 g = 64% der Theorie

Fp.: 65° Lit. Fp.: 65°

Analyse: ber. für $C_5H_7NO_3$ MG: 129,1

Ber.: 10,84% N Gef.: 10,98% N

N-Acetoxymethylsuccinimid[9)]

1,29 g (0,01 Mol) N-Hydroxymethylsuccinimid werden mit der fünffachen Menge Acetanhydrid nach Zufügen eines Tropfens konz. Schwefelsäure eine Stunde lang unter Eiskühlung gerührt. Danach wird zur Bindung des überschüssigen Acetanhydrids Äthanol zugegeben und 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Der gebildete Essigester wird im Vakuum abgezogen und das zurückbleibende Öl weiter eingeengt, bis ein fester Rückstand hinterbleibt. Dieser wird aus Äthanol/Petroläther (60°) umkristallisiert.

Ausbeute 1,46 g = 86% der Theorie

Fp.: 50 - 51° Lit. Fp.: 51°

Analyse: ber. für $C_7H_9NO_4$ MG: 171,16

Ber.: 8,19% N Gef.: 8,25% N

N-Benzoyloxymethylsuccinimid

3,87 g (0,03 Mol) N-Hydroxymethylsuccinimid und 6,8 g (0,03 Mol) Benzoesäureanhydrid werden in 20 ml Pyridin 3 - 4 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend engt man am Rotationsverdampfer ein, bis ein gelbes Öl hinterbleibt. Nach dem Abkühlen verrührt man mit wenig Äthanol, wobei sich nach kurzer Zeit ein kristallines Produkt abscheidet. Man saugt ab, wäscht mit wenig Äthanol nach und trocknet. Das Produkt erwies sich im Dünnschichtchromatogramm als einheitlich.

Ausbeute: 4,5 g = 64,2% der Theorie

Fp.: 124 - 125°

Rf-Wert: 0,9 Fließmittel: Methyläthylketon

Laufstrecke: 17 cm

Analyse: ber. für $C_{12}H_{11}NO_4$ MG: 233,23

Ber.: 6,01% N Gef.: 6,03% N

N-Hydroxymethylnicotinsäureamid[1)]

3 g Nicotinsäureamid, 1 g Paraformaldehyd und 10 mg Natriumhydroxid werden fein verrieben und im Trockenschrank auf 150 - 155° erhitzt. Man nimmt die Schmelze in wenig Äthanol auf und trennt die nach dem Abkühlen erhaltenen Kristalle ab.

Ausbeute: 2,3 g = 61,5% der Theorie

Fp.: 143 - 144°

Analyse: ber. für $C_7H_8N_2O_2$ MG: 152,2

Ber.: 18,42% N Gef.: 18,62% N

N-Acetoxymethylnicotinsäureamid

2 g N-Hydroxymethylnicotinsäureamid werden in der fünffachen Menge Acetanhydrid gelöst, ein Tropfen konz. Schwefelsäure zugefügt und 1 Stunde unter Eiskühlung gerührt. Danach wird ein Überschuß Äthanol zugegeben, zwecks Bildung des Essigesters 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen und der Ester am Rotationsverdampfer abdestilliert. Man evakuiert anschließend bei Zimmertemperatur so lange, bis nur noch ein öliger Rückstand hinterbleibt, der im Kühlschrank bald kristallin erstarrt. Aus Äthanol und Petroläther (40 - 60°) wird ohne Wärmezufuhr umkristallisiert.

Ausbeute: 1,1 g = 43% der Theorie

Fp.: 94 - 95°

Analyse: ber. für $C_9H_{10}N_2O_3$ MG: 194,19

Ber.: 14,41% N Gef.: 14,34% N

N-Benzoyloxymethylnicotinsäureamid

0,75 g (5 mMol) N-Hydroxymethylnicotinsäureamid und 1,13 g (5 mMol) Benzoesäureanhydrid werden unter leichtem Erwärmen in 4 g Pyridin gelöst und bei Zimmertemperatur 1 Stunde lang gerührt. Anschließend gießt man die Lösung in 100 ml Eiswasser; es bildet sich eine milchige Flüssigkeit, aus der sich im Laufe von 2 Stunden bei Zimmertemperatur Kristalle abscheiden. Man saugt ab, trocknet über Phosphorpentoxid und behandelt

mit wenig Äther, um noch vorhandene Benzoesäure herauszulösen. Die Substanz war im Dünnschichtchromatogramm einheitlich.

Ausbeute: 0,6 g = 47% der Theorie

Fp.: 144 - 145°

Rf-Wert: 0,78 Fließmittel: Methyläthylketon

Laufstrecke: 16,8 cm

Analyse: ber. für $C_{14}H_{12}N_2O_3$ MG: 256,26

Ber.: 10,90% N Gef.: 10,88% N

N-Hydroxymethylisonicotinsäureamid[1)]

Der gleiche Ansatz wie bei Nicotinsäureamid wird auf 160 - 165° erhitzt und ebenso aufgearbeitet. Beim Umkristallisieren aus Äthanol wird infolge Formaldehydabspaltung die Verbindung nur in geringer Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 1,8 g = 43% der Theorie

Fp.: 150 - 151°

Analyse: ber. für $C_7H_8N_2O_2$ MG: 152,2

Ber.: 18,42% N Gef.: 18,29% N

N-Acetoxymethylisonicotinsäureamid

Die Darstellung erfolgt analog N-Acetoxymethylnicotinsäureamid aus 2 g N-Hydroxymethylisonicotinsäureamid; verlustreiches Umkristallisieren aus Äthanol/Petrol-

äther.

Ausbeute: 0,9 g = 35% der Theorie

Fp.: 88 - 89°

Analyse: ber. für $C_9H_{10}N_2O_3$ MG: 194,19

Ber.: 14,41% N Gef.: 14,47% N

7-Hydroxymethyltheophyllin

1,8 g (0,01 Mol) Theophyllin (pur. "Merck") werden in 1,2 ml Formalinlösung unter Erhitzen gelöst und bis zur schwach alkalischen Reaktion mit Kaliumcarbonat versetzt. Beim Abkühlen kristallisiert das Reaktionsprodukt aus. Es wird scharf abgesaugt und über Phosphorpentoxid bei Zimmertemperatur getrocknet.

Ausbeute: 1,95 g = 93 % der Theorie

Fp.: 160 - 164° (Zers.)

Analyse: ber. für $C_8H_{10}N_4O_3$ MG: 210,19

Ber.: 26,66% N Gef.: 26,02% N

7-Acetoxymethyltheophyllin[17)]

2,1 g (0,01 Mol) 7-Hydroxymethyltheophyllin werden mit 30 ml Acetanhydrid 45 Minuten lang unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Das ausgefallene Kristallisat wird scharf abgesaugt, mit einer Äther-Ligroinmischung gewaschen und

aus Äthylacetat umkristallisiert.

Ausbeute: 2,17 g = 86% der Theorie

Fp.: 165° Lit. Fp.: 165°

Rf-Wert: 0,75 Fließmittel: Methyläthylketon

Laufstrecke: 12,5 cm

Analyse: ber. für $C_{10}H_{12}N_4O_4$ MG: 252,23

Ber.: 22,21% N Gef.: 22,24% N

7-Acetyltheophyllin

N-Hydroxymethyltheophyllin wird aus siedendem Äthanol umkristallisiert, wobei starke Formaldehydentwicklung erfolgt. Das umkristallisierte Produkt wird in der vorstehend beschriebenen Weise acetyliert und aufgearbeitet. Im Dünnschichtchromatogramm findet sich kein dem N-Acetoxymethyltheophyllin entsprechender Rf-Wert.

Fp.: 152 - 153°

Rf-Wert: 0,32 Fließmittel: Methyläthylketon

Laufstrecke: 12,5 cm

Analyse: ber. für $C_9H_{10}N_4O_3$ MG: 222,20

Ber.: 25,20% N Gef.: 25,29% N

7-Benzoyloxymethyltheophyllin

0,42 g (2 mMol) N-Hydroxymethyltheophyllin und 0,45 g (2 mMol) Benzoesäureanhydrid werden mit 5 ml Pyridin im siedenden Wasserbad 1 Stunde lang erhitzt. Anschließend wird das gleiche Volumen Wasser hinzugegeben und über Nacht stehengelassen. Das ausgefallene Kristallisat wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und zur Entfernung der Benzoesäure zweimal mit Äther behandelt. Der aus feinen Nadeln bestehende Rückstand wird abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 0,46 g = 73% der Theorie

Fp.: 168 - 169°

Rf-Wert: 0,84 Fließmittel: Methyläthylketon

Laufstrecke: 16,7 cm

Analyse: ber. für $C_{15}H_{14}N_4O_4$ MG: 314,30

Ber.: 17,83% N Gef.: 17,75% N

5,5-Diphenylhydantoin[21)]

12 g Benzil und 6 g Harnstoff werden in 250 ml Äthanol gelöst und, nach Zugabe einer Lösung von 20 g Kaliumhydroxid in 30 ml Wasser, zwei Stunden lang im siedenden Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Man gießt in 1 l Wasser ein, filtriert nach 24 Stunden den ausgefallenen Niederschlag ab und leitet in das Filtrat einen CO_2-Strom bis zur Sättigung ein. Das ausgefallene Diphenylhydantoin wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Durch mehrmaliges Umfällen (Lösen in Kalilauge, Ausfällen mit CO_2)

kann man ein sehr reines Produkt erhalten.

Ausbeute: 10 g = 70% der Theorie

Fp.: 290 - 295° (Zers.)

Analyse: ber. für $C_{15}H_{12}N_2O_2$ MG: 252,26

Ber.: 11,08% N Gef.: 11,21% N

N^3-Hydroxymethyl-5,5-diphenylhydantoin

5,04 g (0,02 Mol) 5,5-Diphenylhydantoin werden mit 4 g Formalinlösung (36%) und mit soviel 50%igem wäßrigem Äthanol versetzt, daß im Sieden gerade Auflösung erfolgt. Beim Abkühlen und Stehen über Nacht kristallisiert das Reaktionsprodukt aus. Man saugt scharf ab und trocknet im Vakuum über Phosphorpentoxid.
Aus dem Filtrat lassen sich nach Zugabe von Wasser weitere Mengen der N-Hydroxymethylverbindung gewinnen.

Ausbeute: 5,3 g = 95% der Theorie

Fp.: 186° (Zers.)

Analyse: ber. für $C_{16}H_{14}N_2O_3$ MG: 282,29

Ber.: 9,91% N Gef.: 9,98% N

N^3-Acetoxymethyl-5,5-diphenylhydantoin

2,82 g (0,01 Mol) N^3-Hydroxymethyl-5,5-diphenylhydantoin werden in einem Überschuß Acetanhydrid gelöst und nach Zufügen eines Tropfens konz. Schwefelsäure eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wird Wasser

im Überschuß zugegeben und zum Auskristallisieren in den Kühlschrank gestellt. Die ausgeschiedene Kristallmasse wird abgesaugt und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 3,1 g = 95,6% der Theorie

Fp.: 152°

Analyse: ber. für $C_{16}H_{16}N_2O_4$ MG: 324,32

Ber.: 8,63% N Gef.: 8,68% N

N-Hydroxymethylphthalimid

4,41 g (0,03 Mol) Phthalimid werden in 3 ml Formalinlösung (36%) und 3 ml Wasser unter Zusatz von etwas Kaliumcarbonat in der Siedehitze gelöst. Man läßt abkühlen, saugt die über Nacht abgeschiedenen Kristalle scharf ab und trocknet über Phosphorpentoxid.
Beim Umkristallisieren aus Wasser tritt nahezu vollständige Zersetzung unter Bildung der Ausgangskomponenten ein.

Ausbeute: 5,03 g = 93% der Theorie

Fp.: 140 - 142°

Analyse: ber. für $C_9H_7O_3N$ MG: 177,16

Ber.: 7,91% N Gef.: 7,60% N

N-Benzoyloxymethylphthalimid

1,77 g (0,01 Mol) N-Hydroxymethylphthalimid und 2,26 g (0,01 Mol) Benzoesäureanhydrid werden in 6 g Pyridin gelöst und zwei Stunden lang auf dem siedenden Wasserbad

erhitzt. Man gibt das Gemisch in ca. 300 ml Eiswasser, wobei eine milchig-trübe Lösung entsteht, aus der sich über Nacht ein festes Produkt abscheidet. Nach dem Absaugen und Trocknen wird in Äther aufgenommen und von evtl. Ungelöstem abfiltriert. Das Filtrat wird bis zur Trockne i.V. eingedampft und der Rückstand aus wenig Äthanol umkristallisiert. Man erhält in Form feiner Nadeln eine chromatographisch einheitliche Substanz in guter Ausbeute.

Ausbeute: 2,35 g = 84% der Theorie

Fp.: 108°

Rf-Wert: 0,91 Fließmittel: Chloroform 9
Aceton 1
Laufstrecke: 16,5 cm

Analyse: ber. für $C_{16}H_{11}NO_4$ MG: 281,27

Ber.: 4,98% N Gef.: 4,99% N

N-Cinnamoyloxymethylphthalimid

1,77 g N-Hydroxymethylphthalimid (0,01 Mol) und 2,78 g (0,01 Mol) Zimtsäureanhydrid werden in 6 ml Pyridin unter Erwärmen gelöst und drei Stunden im siedenden Wasserbad gehalten. Die braune, trübe Mischung wird auf 300 ml Eiswasser gegeben und das nach dem Stehen über Nacht im Kühlschrank ausgefallene Produkt scharf abgesaugt. Die bräunliche amorphe Masse wird in wenig Äthanol in der Siedehitze gelöst, und man fügt tropfenweise Wasser

bis zur gerade beginnenden Trübung zu. Dabei setzt langsame Kristallisation ein. Nach dem Abkühlen gibt man mehr Wasser hinzu und läßt im Kühlschrank über Nacht auskristallisieren. Man saugt scharf ab und trocknet im Vakuum über Phosphorpentoxid; die weißen bis leicht gelblichen Kristalle sind löslich in Äther und siedendem Äthanol.

Ausbeute: 2 g = 65% der Theorie

Fp.: 143°

Rf-Wert: 0,87 Fließmittel: Chloroform 9
Aceton 1
Laufstrecke: 16,5 cm

Analyse: ber. für $C_{18}H_{13}NO_4$ MG: 307,31

Ber.: 4,56% N Gef.: 4,54% N

5-Phenyl-oxdiazolthion-(2)[24,36]

34,0 g (0,25 Mol) Benzhydrazid werden in 1000 ml absolutem Dioxan gelöst und mit einer Mischung von 31,6 g (0,275 Mol) Thiophosgen in 100 ml absolutem Dioxan versetzt. Man hält das Reaktionsgemisch 5 Minuten bei einer Temperatur von 95° und destilliert nach Abkühlen der Lösung das Dioxan ab. Der Rückstand wird in 50%igem wäßrigen Äthanol unter Zusatz von Kohle gekocht und heiß filtriert. Beim Abkühlen, ggf. nach Zusatz von Wasser, kristallisieren feine Nadeln aus.

Ausbeute: 28,9 g = 65,5% der Theorie

Fp.: 213° Lit. Fp.: 218°

Analyse: ber. für $C_8H_6N_2OS$ MG: 178,22

Ber.: 15,72% N Gef.: 15,76% N

Ber.: 17,99% S Gef.: 18,03% S

N^3-Hydroxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2)

1,78 g (0,01 Mol) 5-Phenyl-oxdiazolthion-(2) werden mit 1,0 ml Formaldehydlösung (36%) und 45 ml eines Äthanol-Wasser-Gemisches (1 : 1) zum Sieden erhitzt. Der abgekühlten Lösung fügt man bis zur beginnenden Kristallisation tropfenweise Wasser zu; man läßt dann über Nacht bei Zimmertemperatur auskristallisieren, saugt ab und trocknet.

Ausbeute: 1,83 g = 87% der Theorie

Fp.: 127 - 128°

Analyse: ber. für $C_9H_8N_2O_2S$ MG: 208,2

Ber.: 13,44% N Gef.: 13,63% N

Ber.: 15,36% S Gef.: 15,22% S

N^3-Acetoxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2)

1,04 g (5 mMol) N-Hydroxymethyl-5-phenyl-oxdiazolthion-(2) werden in 7 g Pyridin gelöst und mit 0,51 g (5 mMol) Acetanhydrid 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur gerührt. Die Lösung wird in 100 ml Eiswasser gegeben. Aus der milchig-

trüben Flüssigkeit scheidet sich nach kurzer Zeit ein festes, teilweise kristallines Produkt ab; man erhitzt das Rohprodukt in 50%igem wäßrigen Äthanol zum Sieden und fügt der noch heißen Lösung unter Umschwenken Wasser zu. Beim Abkühlen kristallisiert das Produkt in schönen Nadeln aus.

Ausbeute: 0,8 g = 66% der Theorie

Fp.: 116 - 117°

Rf-Wert: 0,9 Fließmittel: Chloroform 9
Aceton 1
Laufstrecke: 16,5 cm

Analyse: ber. für $C_{11}H_{10}N_2O_3S$ MG: 250,22

Ber.: 11,18% N Gef.: 11,21% N

Ber.: 13,19% S Gef.: 13,36% S

5-Pyrazyl-oxdiazolthion-(2)[24,37]

69,1 g (0,5 Mol) Pyrazinhydrazid werden in 250 ml absolutem Dioxan suspendiert und unter Eiskühlung und starkem Rühren mit einer Lösung von 63,2 g (0,6 Mol) Thiophosgen in absolutem Dioxan versetzt. Man rührt noch 4 Stunden bei Zimmertemperatur, destilliert das Dioxan im Vakuum ab und kristallisiert den Rückstand zweimal unter Zusatz von Aktivkohle aus viel Wasser um.

Ausbeute: 51 g = 56,5% der Theorie

Fp.: 207-208° Lit. Fp.: 213°

Analyse: ber. für $C_6H_4N_4OS$ MG: 180,2

Ber.: 31,08% N Gef.: 30,88% N

Ber.: 17,78% S Gef.: 17,96% S

N^3- Hydroxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2)

1,8 g (0,01 Mol) 5-Pyrazyl-oxdiazolthion-(2) und 0,8 ml (0,01 Mol) einer 36%igen Formalinlösung werden mit soviel Wasser erhitzt, daß im Sieden gerade Auflösung erfolgt. Beim Stehenlassen über Nacht kristallisiert das Produkt in Form gelblicher Kristalle aus.

Ausbeute: 1,6 g = 76% der Theorie

Fp.: 151 - 152°

Analyse: ber. für $C_7H_6N_4OS$ MG: 210,22

Ber.: 26,65% N Gef. 26,74% N

Ber.: 15,24% S Gef.: 15,21% S

N^3-Benzoyloxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2)

2,1 g (0,01 Mol) N-Hydroxymethyl-5-pyrazyl-oxdiazolthion-(2) werden in 10 ml Pyridin gelöst und mit etwas mehr als der berechneten Menge Benzoesäureanhydrid (ca. 3 g) 4 Stunden lang bei Zimmertemperatur gerührt. Man gibt die dunkelbraune Reaktionslösung auf 500 ml Eiswasser, wobei sich über Nacht ein amorphes, gelbliches Produkt abscheidet. Nach dem Trocknen wird das Rohprodukt mit 500 ml Ligroin, dem 10 ml Äthanol zugefügt sind, unter Rückfluß bis zum Sieden erhitzt; von evtl. Ungelöstem wird abfiltriert. Nach mehreren Stunden kristallisiert das gewünschte Produkt in farblosen Nadeln aus. Im Dünnschichtchromatogramm erweist es

sich als einheitlich.

Ausbeute: 2,1 g = 67% der Theorie

Fp.: 98 - 99°

Rf-Wert: 0,61 Fließmittel: Chloroform 9
Aceton 1
Laufstrecke: 17 cm

Analyse: ber. für $C_{14}H_{10}N_4O_3S$ MG: 314,2

Ber.: 17,82% N Gef.: 17,58% N

Ber.: 10,19% S Gef.: 10,26% S

N-Hydroxymethyl-imidazolthion-(2)

1,0 g (10 mMol) Imidazolthion-(2) werden mit 0,9 ml (0,01 Mol) Formalinlösung (36%) und 1 ml Wasser zum Sieden erhitzt, wobei vollständige Lösung eintritt. Nach mehrstündigem Stehen werden die ausgeschiedenen Kristalle abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 1,15 g = 88% der Theorie

Fp.: 158 - 159°

Analyse: ber. für $C_4H_6N_2OS$ MG: 130,1

Ber.: 21,53% N Gef.: 21,44% N

Ber.: 24,61% S Gef.: 24,65% S

N-Acetoxymethyl-N'(S)-acetyl-imidazolthion-(2)

1,3 g (0,01 Mol) N-Hydroxymethylimidazolthion-(2) werden mit 7 ml eines Gemisches aus Acetanhydrid und Pyridin (1 : 1) unter Erwärmen gelöst. Nach zweistündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand zweimal in Äthanol aufgenommen und wiederum eingedampft; anschließend wird aus wenig Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,4 g = 65,7% der Theorie

Fp.: 114°

Analyse: ber. für $C_8H_{10}N_2O_3S$ MG: 214,24

Ber.: 13,08% N Gef.: 13,06% N

Ber.: 14,95% S Gef.: 15,17% S

N-Acetoxymethyl-imidazolthion-(2)

1,0 g der vorstehend beschriebenen Verbindung werden in 50 ml Wasser 24 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Die klare Lösung wird im Vakuum bis zur Kristallbildung eingeengt.

Ausbeute: 0,59 g = 73,5% der Theorie

Fp.: 126 - 128°

Analyse: ber. für $C_6H_8N_2O_2S$ MG: 172,21

Ber.: 16,27% N Gef.: 16,30% N

Ber.: 18,60% S Gef.: 18,55% S

N,N'-Bis(hydroxymethyl)-imidazolthion-(2)

2,0 g (0,01 Mol) Imidazolthion-(2), 3,6 ml (0,02 Mol) Formalinlösung (36%) und 10 ml Wasser werden bis zur Lösung erwärmt. Beim Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank scheiden sich Kristalle ab; man saugt ab und trocknet i.V. über P_2O_5.

Ausbeute: 2,28 g = 71,5% der Theorie

Fp.: 127°

Analyse: ber. für $C_5H_8N_2O_2S$ MG: 160,21

Ber.: 17,50% N Gef.: 17,38% N

Ber.: 20,00% S Gef.: 20,07% S

N,N'-Bis(acetoxymethyl)-imidazolthion-(2)

1,6 g (0,01 Mol) N,N'-Bis(hydroxymethyl)-imidazolthion-(2) und 7 ml Acetanhydrid werden unter vorsichtigem Erwärmen gelöst. Man läßt 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, gibt dann Äthanol hinzu und dampft i.V. ein. Dieser Arbeitsgang wird zweimal wiederholt. Der Rückstand wird aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,5 g = 61,5% der Theorie

Fp.: 120 - 121°

Analyse: ber. für $C_9H_{12}N_2O_4S$ MG: 244,27

Ber.: 14,47% N Gef.: 14,47% N

Ber.: 13,11% S Gef.: 13,10% S

4-tert.-butyl-imidazolthion-(2)[38]

1. Brompinacolon

Zu einer eiskalten Lösung von 40 g Pinacolon[39] in 500 ml abs. Äther, der 1 g Aluminiumchlorid enthält, werden innerhalb von 30 Minuten 63 g Brom zugetropft. Es wird weitere 30 Minuten gerührt und das Gemisch auf Wasser gegossen; die organische Phase wurde abgetrennt, mehrfach mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum destilliert.

Ausbeute: 50 g = 61% der Theorie

Kp.: 47 - 49°/1 Torr

Lit. Kp.: 47 - 49°/1 Torr

2. Phthalimidopinacolon

50 g Brompinacolon, 60 g Kaliumphthalimid und 180 ml abs. Benzol werden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird filtriert und der Rückstand mit Benzol gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden bis zur beginnenden Trübung mit Petroläther versetzt. Nach dem Stehen über Nacht im Kühlschrank scheiden sich feine weiße Kristalle ab.

Ausbeute: 46 g = 67% der Theorie

Fp.: 99 - 101°

Lit. Kp.: 100 - 102°

3. 4-tert.-butyl-imidazolthion-(2)

46 g Phthalimidopinacolon, 250 ml konz. Salzsäure und 180 ml Essigsäure werden unter Rühren 10 Stunden am Rückfluß gekocht. Das Gemisch wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit heißem Wasser extrahiert und die wäßrige Lösung wiederum eingedampft. Der Rückstand wird in Äthanol aufgenommen und mit Äther das Aminoketon-Hydrochlorid gefällt (14,8 g).

Das Salz wird zusammen mit einer Lösung von 12,6 g Kaliumrhodanid in 21 ml Wasser 2 Stunden lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Beim Erkalten fällt 4-t-butyl-imidazolthion-(2) aus, das aus Äthanol umkristallisiert wird.

Ausbeute: 9 g = 45% der Theorie

Fp.: 235°

Lit. Fp.: 234,2 - 235,4°

N-Hydroxymethyl-4-t.-butyl-imidazolthion-(2)

3,12 g (0,02 Mol) 4-tert.-butyl-imidazolthion-(2) und 2,0 ml (0,028 Mol) Formalin (40%) werden mit 100 ml Wasser 3 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird zur Kristallisation in den Eisschrank gestellt.

Ausbeute: 3,1 g = 79% der Theorie

Fp.: 145 - 146°

Analyse: ber. für $C_8H_4N_2OS$ MG: 186,2

Ber.: 15,04% N Gef.: 14,72% N

Ber.: 17,20% S Gef.: 17,46% S

N-Acetoxymethyl-4-tert.-butyl-imidazolthion-(2)

1,86 g (0,01 Mol) N-Hydroxymethyl-4-tert.-butyl-imidazolthion-(2) werden in 10 ml Pyridin/Acetanhydrid (1 : 1) gelöst, wobei leichte Erwärmung eintritt. Nach 18-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird im Vakuum eingedampft; der Rückstand wird aus Äthanol und Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 1,63 g = 71,5% der Theorie

Fp.: 188°

Analyse: ber. für $C_{10}H_{16}N_2O_2S$ MG: 228,31

Ber.: 12,38% N Gef.: 12,06% N

Ber.: 14,15% S Gef.: 14,15% S

N,N'-Bis(hydroxymethyl)-benzimidazolthion-(2)[1)]

4,5 g (0,03 Mol) Benzimidazolthion-(2) werden fein pulverisiert in 600 ml Wasser suspendiert und mit 5 ml Formaldehydlösung (36%) 24 Stunden kräftig gerührt. Man saugt den Niederschlag ab, engt das Filtrat im Vakuum etwas ein, saugt wiederum vom Ausgefallenen ab und trocknet im Vakuum über Phosphorpentoxid.

Ausbeute: 6,1 g = 97% der Theorie

Fp.: 162 - 164°

Analyse: ber. für $C_9H_{10}N_2O_2S$ MG: 210,2

Ber.: 13,31% N Gef.: 13,40% N

Ber.: 15,24% S Gef.: 14,96% S

N,N'-Bis(acetoxymethyl)-benzimidazolthion-(2)

2,1 g N,N'-Bis(hydroxymethyl)-benzimidazolthion-(2) werden in 6 g Pyridin gelöst und mit 2 g Acetanhydrid über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach einiger Zeit beginnt das Rohprodukt sich kristallin abzuscheiden. Am nächsten Morgen gibt man zur vollständigen Ausfällung einige ml Äthanol hinzu, läßt 30 Minuten stehen, saugt ab und wäscht mit wenig Äthanol nach.

Ausbeute: 1,7 g = 57% der Theorie

Fp.: 154 - 155°

Rf-Wert: 0,88 Fließmittel: Chloroform 9
Aceton 1
Laufstrecke: 15 cm

Analyse: ber. für $C_{13}H_{14}N_2O_4S$ MG: 294,35

Ber.: 9,52% N Gef.: 9,69% N

Ber.: 10,89% S Gef.: 10,81% S

b.) Biochemischer Teil

1. Stabilitätsmessung mit der Warburg-Technik

Einer Ratte wurde unmittelbar nach dem Dekapitieren 0,3 g Lebergewebe herauspräpariert und mit 5 ml eiskalter 0,15 m KCl-Lösung im Potter-Elvehjem-Gerät homogenisiert. Das Homogenat wird 1 : 4 mit KCl-Lösung verdünnt, und 0,2 ml dieser Verdünnung werden in die Warburg-Gefäße gegeben, in die zuvor 0,5 ml einer 0,05 m $NaHCO_3$-Lösung sowie 2,1 ml einer 0,05 m wäßrigen Lösung des jeweiligen Esters pipettiert wurden; (Gesamtvolumen = 2,8 ml). Wasserunlösliche Substanzen kommen in Form von Kristallsuspensionen zur Anwendung.

Zur Prüfung der Stabilität gegenüber Ascitestumorzellen werden einer Maus mit starker Ascitesbildung (Inokulation etwa 10 Tage vorher) nach Tötung der Ascites aus der nicht eröffneten Peritonealhöhle entnommen, mit der 1 1/2-fachen Menge eiskalter 0,15 m KCl-Lösung versetzt, wie o.a. homogenisiert und 0,2 ml dieser Suspension statt des Rattenleberhomogenats in die Warburg-Gefäße gegeben.

Die Warburg-Gefäße werden unter Eiskühlung zwecks CO_2-Sättigung 5 Minuten lang mit einem Stickstoff-Kohlendioxid-Gasgemisch (95 : 5) begast. Anschließend

wird im Wasserbad bei 37° geschüttelt. Über mehrere Stunden hin wird im Abstand von 15 Minuten die jeweilige CO_2-Entwicklung abgelesen.

Zum Vergleich wird parallel für jede Substanz die nur durch wäßriges Milieu bzw. Homogenat hervorgerufene CO_2-Entwicklung gemessen.

2. Stabilitätsmessung mit der Eisen-Hydroxamat-Reaktion

1 g Rattenleber wird sofort nach dem Herauspräparieren mit 4 ml eiskalter 0,05 m KCl-Lösung versetzt, homogenisiert und 0,4 ml der Verdünnung in kleine Zentrifugengläser gegeben, in die zuvor 0,2 ml einer 5×10^{-3} m wäßrigen Lösung von Acetoxymethylpiperidin und 1,8 ml Wasser gegeben wurde. Sofort nach der Zugabe des Homogenats, nach 1 und nach 2-stündigem Schütteln der Gläser im Wasserbad bei 37° werden 1 ml 3m Hydroxylaminlösung, 1,4 ml Trichloressigsäure (100%) und 0,6 ml 2m Eisen-(III)chloridlösung zugefügt, und 10 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Vom Überstand wird, ggf. nach Filtrieren durch Watte, in 1 cm Glaskuvetten bei 520 nm im Zeiß Spektralphotometer PMQ II die Extinktion bestimmt.

3. Einbau von markierten Substanzen in Ascites-Zellsuspensionen

Herstellung der Zellsuspension:

Einer Maus mit starker Ascitesbildung werden aus der uneröffneten Peritonealhöhle mit einer Injektionsspritze 4 - 6 ml Ascitesflüssigkeit entnommen und mit Puffer unter Zugabe von ca. 0,1 ml Liquemin auf 200 ml verdünnt (= 1 : 50). Hiervon werden je 40 ml pro Ansatz in Arbeit genommen.

Versuch:

In ein auf 37° thermostiertes Wasserbad werden in 150 ml Bechergläser, die mit Rührmotoren beschickt sind, jeweils 40 ml der Zellsuspension gegeben. Anschließend erfolgt Zugabe der Hemmsubstanzen, so daß deren Endkonzentration 10^{-3} bzw. 5×10^{-4} beträgt, die Kontrollen werden mit Puffer auf die gleiche Anzahl ml gebracht.

Nach 10, 40, 70 und 100 Minuten werden jeweils 1 ml entnommen und zu jeweils 0,1 ml C_{14}-Thymidin, C_{14}-Uridin und C_{14}-Leucin pipettiert, die sich in 10 ml Zentrifugengläser unter Eiskühlung befinden. Die so präparierten Gläser werden 20 Minuten lang bei 37° im Wasserbad geschüttelt.

Nach dieser Inkubation werden die Gläser in Eis gestellt, mit 8 ml kalter Ringerlösung versetzt und bei 0°

in der Stock-Zentrifuge 4 Minuten (Stufe I) abzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, der Niederschlag im Eisbad mit 8 ml 5%iger Trichloressigsäure versetzt, umgerührt und 30 Minuten im Eis stehengelassen. Nach erneuter Zentrifugation (Stufe VI, 10 min., Zimmertemp.) wird der Überstand abermals verworfen.

Der Niederschlag wird auf einem Membranfilter von 21 mm Durchmesser (MF 100/11005, Fa. Sartorius, Göttingen) abgenutscht, das Zentrifugenglas und der Niederschlag werden zweimal mit 4 ml 5%iger TCA ausgespült bzw. nachgewaschen. Die Filter werden 15 Minuten bei 80° getrocknet, dann in die mit 5 ml Toluol-Szintillatorflüssigkeit beschickten Gläschen gegeben und im Packard Scintillation Spectrometer 3003 ausgezählt.

Puffer:[40]	NaCl	40,0
(Phosphatgepufferte	KCl	1,0
Saline)	KH_2PO_4	1,0
	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	5,75
	$CaCl_2$	0,5
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,5
	Aqua dest. ad	5000,0

Toluol-Szintillator:[41)]

PPO	5,0
POPOP	0,1
Toluol	1000,0 ml

Das verwendete Toluol wurde vorher über eine Kolonne destilliert.

Für anregende Diskussionen und methodische Ratschläge bei der Durchführung der Einbauversuche danke ich den Herren Dr. D. Kummer, Dr. S. Seeber und Dr. P. Warnecke vom Isotopenlabor des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tübingen.

4. Ganztierversuche:

11 weiße Laboratoriumsmäuse werden am 1. Versuchstag mit 0,25 ml Ascitesflüssigkeit intraperitoneal geimpft. Vom 2. bis 10. Tag nach der Inokulation erhält die Kontrollgruppe täglich 0,5 ml Ringerlösung i.p., die anderen Gruppen erhalten 0,5 ml der betreffenden Substanz. In Wasser schwer- bzw. unlösliche Substanzen emulgiert man durch Zusatz von 5% Propylenglykol. Am 11. Versuchstag werden alle Tiere getötet und die Ascitesflüssigkeit gewogen.

Frau Eva Hoffmann danke ich für die Durchführung der Tierversuche.

5. Zusammenfassung

Die Veresterung der N-Hydroxymethylverbindungen von Piperidin, Morpholin, Succinimid, Phthalimid, Diphenylhydantoin, Theophyllin sowie von verschieden substituierten Imidazolthionen-(2) und Oxdiazolthionen-(2) mit Essigsäure, Benzoesäure und Zimtsäure wird beschrieben. Die Veresterung verlangsamt den Zerfall der zugrundeliegenden cytostatisch hochwirksamen N-Hydroxymethylverbindungen.

Die Säurekomponenten wurden als Anhydride eingesetzt. Wegen der raschen Hydrolyse der Ausgangssubstanzen wurden die Umsetzungen unter sehr schonenden Bedingungen durchgeführt. Die Identifizierung der N-Hydroxymethylverbindungen und der Ester erfolgte durch Elementaranalyse, Dünnschichtchromatographie, IR- und NMR-Spektren.

Die Ester verhalten sich in wäßrigem, annähernd neutralem Milieu bei 37° sehr unterschiedlich; die Spontanhydrolyse unter Freisetzung der Säure und der N-Methylolkomponente nimmt wenige Stunden bis zu mehreren Tagen in Anspruch.

Die Inkubation der Ester mit Rattenleber- und Mäuseasciteshomogenaten führt bei einigen Verbindungen, die sich in wäßriger Lösung sehr stabil verhalten, zu einer

raschen Hydrolyse. Homogenate aus Rattenleber bewirken im allgemeinen eine stärkere Hydrolyse als solche aus Asciteszellen.

In-vitro-Versuche an Asciteszellen ergaben, daß die Ester die Einbauraten von radioaktiv markiertem Thymidin, Uridin und Leucin langsamer hemmen als die entsprechenden N-Hydroxymethylverbindungen, was auf allmähliche Hydrolyse während der Inkubation hindeutet.

In-vivo-Versuche am Mäuse-Ascitescarcinom zeigten ebenfalls, daß die Ester gegenüber freien N-Hydroxymethylverbindungen eine verzögerte Wirkung besitzen, bzw. höher dosiert werden müssen. Intakte Ester haben keinen Einfluß auf das Wachstum des Ascitescarcinoms.

6. Literaturverzeichnis

1) G. Weitzel, F. Schneider, A.M. Fretzdorff, K. Seynsche und H. Finger, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 334, 1 (1963)

2) L. Henry, Ber. dtsch. chem. Ges. 28 (ref.), 851 (1895)

3) H. Boehme und N. Kreutzkamp, Marburger Sitzungsber. 76, 19 (1953)

4) F. Sachs, Ber. dtsch. chem. Ges. 31, 3230 (1898)

5) A. Einhorn, Liebigs Ann. Chem. 343, 207 (1905)

6) A. Einhorn, Liebigs Ann. Chem. 361, 33 (1908)

7) A. Einhorn und A. Hamburger, Ber. dtsch. chem. Ges. 41, 24 (1908)

8) O. Moldenhauer, W. Irion, und H. Marwitz, Liebigs Ann. Chem. 583, 37 (1953)

9) E. Cherbuliez und G. Sulzer, Helv. chim. Acta 8, 567 (1925)

10) E. Cherbuliez und G. Sulzer, Helv. chim. Acta 5, 678 (1922)

11) P.O. Pawney et al., J. org. Chemistry 26, 15 (1961)

12) G. Zinner und H. Böhlke, Arch. Pharmaz. 299, 81 (1966)

13) H. Hellmann und G. Opitz, -Aminoalkylierung, (Weinheim 1960)

14) H. Hellmann und G. Opitz, Ang. Chem. 68, 265 (1956)

15) K. Bodendorf und G. Koralewski, Arch. Pharmaz. 271, 101 (1933)

16) H. Hellmann, Ang. Chem. 69, 463 (1957)

17) H.J. Roth und R. Brandes,
Arch. Pharmaz. 298, 765 (1965)

18) H. Boehme, H.J. Bohn, E. Köhler und J. Roehr,
Liebigs Ann. Chem. 664, 130 (1963)

19) H. Boehme und G. Seitz,
Arch. Pharmaz. 299, 695 (1966)

20) H. Hellmann und G. Opitz,
Chem. Ber. 89, 81 (1956)

21) H. Biltz,
Ber. dtsch. chem. Ges. 41, 1391 (1908)

22) H. Suhr,
Anwendungen der Kernmagnetischen Resonanz in der Organischen Chemie, Springer-Verlag (1965)

23) H. Zinner, O. Schmitt, W. Schritt und G. Rembarz,
Chem. Ber. 90, 2852 (1957)

24) D. Zinser,
Dissertation Tübingen 1967

25) W. Otting,
Spektrale Zuordnungstafel der Infrarot-Absorptionsbanden, Springer-Verlag (1963)

26) W. Werner,
Arch. Pharmaz. 299, 513 (1966)

27) R.W. Cowgill, A.B. Pardee,
Experiments in Biochemical Research Techniques
John Wiley Sons, Inc., New York, 1957

28) W.M. Conners et al.,
J. Biol. Chem. 184, 29 (1950)

29) J.M. Clark,
Experimental Biochemistry, S. 174,
W.H. Freeman, San Francisco (1964)

30) P. Obrecht,
Habilitationsschrift Freiburg 1961

31) G. Palme und E. Liss,
Klin. Wschr. 41, 291 (1963)

32) G. Palme, E. Liss und F. Wiebel,
Naturwiss. 51, 197 (1964)

33) G. Weitzel, F. Schneider, D. Kummer und H. Ochs,
Z. Krebsforsch. 70, 354 (1968)

34) E. Stahl,
Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag (1967)

35) E. Merck A.G., Darmstadt
Chromatographie

36) E. Hoggarth,
J. chem. Soc. (London) 1952, 4811

37) A.E. Wilder Smith, E. Frommel,
Arzneimittelf. 12, 485 (1962)

38) M. Jackman, M. Klenk, B. Fishburn,
B.F. Tuller, S. Archer,
J. Amer. chem. Soc. 70, 2884 (1948)

39) Org. Synth. I, 451

40) E.M. Martin, J. Malec, S. Sved, T.S. Work,
Bioch. J. 80, 585 (1961)

41) J. Elovson,
Biochim. Biophys. Acta 84, 275 (1964)

42) G. Bachmann und L. Heisey,
J. Amer. chem. Soc. 68, 2496 (1946)

43) K. Hofmann,
Imidazole and its derivatives, S. 99,
Interscience Publ., Inc., New York 1953

44) K. Hofmann,
Imidazole and its derivatives, S. 48, 274,
Interscience Publ., Inc., New York 1953

45) E. Bamberger,
Liebigs Ann. Chem. 273, 267, 342 (1893)

46) O. Gerngroß,
Chem. Ber. 46, 1908 (1913)

47) G. Weitzel, E. Buddecke, F. Schneider und H. Pfeil,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 325, 65 (1961)

48) F. Pregl und H. Roth,
Quantitative organische Mikroanalyse, S. 151
7. Aufl., Springer-Verlag 1958

49) G. Jander und O. Pfundt,
Die konduktometrische Maßanalyse, Stuttgart 1945

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 30. Dezember 1939 in Berlin als Sohn des Lehrers Arthur Keup und seiner Ehefrau Ursula, geb. Noortwyck, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschulen in Berlin und Groß-Schwülper, Kreis Gifhorn (Niedersachsen), trat ich Ostern 1950 in die Gaußschule, Gymnasium für Jungen, in Braunschweig ein, an der ich im März 1959 die Reifeprüfung bestand.

Nach zweijähriger Tätigkeit als Apothekerpraktikant studierte ich von Sommersemester 1961 bis Wintersemester 1963/64 an der Technischen Hochschule Braunschweig Pharmazie und Lebensmittelchemie und legte im April 1964 die Pharmazeutische Staatsprüfung ab.

Von Mai bis Oktober 1964 war ich als Kandidat der Pharmazie in der Rats-Apotheke in Gifhorn tätig und setzte anschließend, ebenfalls an der Technischen Hochschule Braunschweig, das Lebensmittelchemiestudium fort, das ich im Juli 1966 mit der Lebensmittelchemiker-Hauptprüfung abschloß.

Im September 1966 begann ich mit der Bearbeitung des in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Themas unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Botanik:	Bogen, Metzner
Physik:	Cario
Anorganische Chemie:	Hartmann
Organische Chemie:	Inhoffen, Quinkert
Pharmazeutische Chemie:	Auterhoff, Knabe, Roth
Lebensmittelchemie:	Thaler
Physiologische Chemie:	Schneider, Weitzel
Pharmazeutische Technologie:	Awe
Pharmakognosie:	Steffen
Pharmakologie:	Lembeck, Weigmann
Bakteriologie:	Popp .

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen